



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΑ microRNAs ΩΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ
ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΤΟΥ ΜΥΟΣΚΕΛΕΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

ΑΝΔΡΕΑΔΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

Βιολόγος

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ (Επιβλέπουσα καθηγήτρια)

ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ (Μέλος)

ΤΖΕΤΗ ΜΑΡΙΑ (Μέλος)

Λάρισα, 2016

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	Σελ.
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	7
A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	8
A.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
A.1.1. Παθογένεση των αρθρώσεων στις λοιμώξεις του μυοσκελετικού συστήματος.....	8
A.1.2. Προδιαθεσικοί παράγοντες.....	8
A.2. Ο ρόλος της γενετικής και της επιγενετικής στην παθογένεση των ασθενειών.....	9
A.2.1. Η έννοια των μονο-νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών.....	9
A.2.2. Η έννοια των επιγενετικών τροποποιήσεων.....	10
A.2.2.1. Η μεθυλίωση του DNA.....	10
A.2.2.2. Η τροποποίηση των ιστονών.....	10
A.2.3. Σύνδεση μεταξύ μεθυλίωσης του DNA και μονο-νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών, σχετιζόμενων, με την εκδήλωση ασθενειών.....	11
A.2.4. Σύνδεση μεταξύ προσβασιμότητας της χρωματίνης, μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των ιστονών και μονο-νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών, σχετιζόμενων, με την εκδήλωση ασθενειών.....	11
A.2.5. Οι μονο-νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί στους TLRs σχετίζονται με την ευαισθησία ενός ατόμου έναντι μιας λοιμώδους ασθένειας.....	12
A.2.5.1. Μονο-νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί στον TLR2.....	13
A.2.5.2. Μονο-νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί στον TLR4.....	14
A.2.6. Η κατανόηση των ανοσιακών μηχανισμών αποτελεί προϋπόθεση για τη βελτίωση της ποιότητας ζωής.....	14
A.3. Επισκόπηση της φλεγμονώδους απόκρισης.....	15
A.4. Σηπτική αρθρίτιδα.....	16
A.4.1. Εισαγωγή.....	16
A.4.2. Οι κυριότεροι μικροβιακοί παράγοντες κινδύνου εμφάνισης της σηπτικής αρθρίτιδας.....	17

A.4.3. Οι κυριότεροι λοιμογόννοι παράγοντες του <i>Staphylococcus aureus</i> που σχετίζονται με την εκδήλωση σηπτικής αρθρίτιδας.....	18
A.4.3.1. Οι πρωτεΐνες ClfA (Clumping factor A) και ClfB (Clumping factor B)..	18
A.4.3.2. Οι πρωτεΐνες FnBPA (Fibronectin-binding protein A) και FnBPB (Fibronectin-binding protein B).....	18
A.4.3.3. Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμένα.....	18
A.4.3.4. Η ικανότητα αποφυγής της ανοσιακής άμυνας του ξενιστή.....	19
A.4.3.5. Πρόγνωση.....	19
A.4.3.6. Λοιμώξεις περιπροθετικών αρθρώσεων: Μία ιδιαίτερη περίπτωση.....	20
A.4.3.6.1. Παράγοντες κινδύνου.....	20
A.4.3.6.2. Κλινικά συμπτώματα.....	21
A.4.3.6.3. Διάγνωση.....	21
A.4.4. Η φλεγμονώδης απόκριση στην περίπτωση της σηπτικής αρθρίτιδας..	22
A.4.4.1. Η δράση των κυτοκινών των μακροφάγων	23
A.4.4.2. Ο ρόλος των κυτοκινών των Τ λεμφοκυττάρων.....	23
A.4.4.3. Η σχέση μεταξύ των κυτοκινών, TNFα, IL-1b και IL-6 και της αρθρικής καταστροφής.....	24
A.4.4.4. Η σύνδεση μεταξύ των κυτοκινών, των μεταλλοπρωτεασών και της αρθρικής καταστροφής.....	24
A.4.4.5. Ο ρόλος των κυττάρων FLS (Fibroblast-like synoviocytes) στη φλεγμονώδη απόκριση και στην καταστροφή της άρθρωσης.....	24
A.5. Οι υποδοχείς Toll-like (Toll-like receptors, TLRs) και η σημασία τους στη φλεγμονώδη απόκριση.....	25
A.5.1. Γενικές πληροφορίες για τους TLRs.....	25
A.5.2. Η κατηγοριοποίηση των TLRs με βάση το είδος των μικροβιακών παραγόντων που προσδένονται στην εξωκυτταρική τους επικράτεια.....	26
A.5.3. Ο μηχανισμός λειτουργίας των υποδοχέων Toll-like.....	27
A.5.4. Οι κατηγορίες σηματοδοτικών καταρρακτών που επάγει η ενεργοποίηση των TLRs.....	28
A.5.4.1. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εξαρτώνται από την πρωτεΐνη-προσαρμογέα MyD88.....	28
A.5.4.1.1. Το NF-κΒ σηματοδοτικό μονοπάτι επάγει την έκφραση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και χημοκινών.....	28

A.5.4.1.2. Τα MAPK σηματοδοτικά μονοπάτια οδηγούν στην παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών.....	29
A.5.4.1.3. Οι TLR4 και TLR2 ενεργοποιούν τον NF-κΒ.....	29
A.5.4.2. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εξαρτώνται από την πρωτεΐνη-προσαρμογέα TRIF.....	30
A.6. Τα microRNAs ρυθμίζουν την έκβαση των σηματοδοτικών μονοπατιών που επάγονται από την ενεργοποίηση των TLRs.....	31
A.7. Τα microRNAs.....	32
A.7.1. Γενικές πληροφορίες.....	32
A.7.2. Η βιογένεση των microRNAs.....	33
A.7.3. Ο μηχανισμός της γονιδιακής αποσιώπησης μέσω των microRNAs....	34
A.7.4. Το ρυθμιστικό δυναμικό των microRNAs.....	35
A.8. Η σχέση μεταξύ της ρυθμιστικής δράσης των miRNAs στη γονιδιακή έκφραση και της παθογένεσης των λοιμώξεων.....	35
A.9. Τα εξωκυττάρια microRNAs ως δυνητικοί βιοδείκτες ασθενειών.....	36
A.9.1. Η ανθεκτικότητα των microRNAs στις RNAάσες των βιολογικών υγρών.....	37
A.9.1.1. Τα εξωσώματα.....	38
A.9.1.2. Τα σωματίδια υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών.....	38
A.9.1.3. Οι πρωτεΐνες Ago2 (Argonaute 2) και NMP1 (Nucleophosmin 1).....	39
A.9.2. Παθητική έκκριση των miRNAs.....	40
A.10. Τα χαρακτηριστικά του ιδανικού βιοδείκτη και ποια από αυτά διαθέτουν τα εξωκυττάρια miRNAs.....	40
A.11. Μελέτες διερεύνησης των εξωκυττάρων miRNAs ως βιοδείκτες μικροβιακών λοιμώξεων.....	41
A.12. Σκοπός μελέτης.....	47
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	48
B.1. Υλικά και Μέθοδοι.....	48
B.1.1. Συλλογή δειγμάτων.....	48
B.1.2. Καλλιέργειες κυττάρων υμένα.....	48
B.1.2.1. Απομόνωση κυττάρων υμένα.....	48
B.1.2.2. Ανακαλλιέργεια κυττάρων υμένα.....	50
B.1.2.3. Κατάψυξη και απόψυξη κυττάρων υμένα.....	50
B.1.3. Απομόνωση ορού από περιφερικό αίμα.....	51

B.1.4. Απομόνωση RNA.....	51
B.1.4.1. Απομόνωση RNA από τον ορό.....	51
B.1.4.2. Απομόνωση RNA από καλλιέργειες κυττάρων.....	52
B.1.4.3. Φωτομέτρηση του RNA – Έλεγχος ποσότητας.....	53
B.1.4.4. Ηλεκτροφόρηση του RNA – Έλεγχος ποιότητας.....	53
B.1.5. Ποσοτικοποίηση των miRNAs:miR-21, miR-16, miR-125, miR-19a, miR-19b, miR-223, miR-365 με τη μέθοδο της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time-PCR).....	53
B.1.5.1. Ανίχνευση και ποσοτικοποίηση miRNAs στον ορό.....	53
B.1.5.2. Ανίχνευση και ποσοτικοποίηση miRNAs σε κύτταρα αρθρικού υμένα.....	54
B.1.6. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (quantitative Real – time PCR, qRT – PCR).....	56
B.1.7. Βιοπληροφορική ανάλυση.....	59
B.1.8. Στατιστική Ανάλυση.....	59
B.2. Αποτελέσματα.....	60
B.2.1. Μελέτη της σχετικής έκφρασης του miR-19a σε καλλιέργειες φυσιολογικών κυττάρων αρθρικού υμένα και κυττάρων αρθρικού υμένα ασθενών με λοίμωξη από το στέλεχος <i>Staphylococcus aureus</i>	60
B.2.2. Μελέτη της σχετικής έκφρασης του miR-19b σε καλλιέργειες φυσιολογικών κυττάρων αρθρικού υμένα και κυττάρων αρθρικού υμένα ασθενών με λοίμωξη από το στέλεχος <i>Staphylococcus aureus</i>	60
B.2.3. Μελέτη της σχετικής έκφρασης του miR-16 σε καλλιέργειες φυσιολογικών κυττάρων αρθρικού υμένα και κυττάρων αρθρικού υμένα ασθενών με λοίμωξη από το στέλεχος <i>Staphylococcus aureus</i>	61
B.2.4. Μελέτη της σχετικής έκφρασης του miR-21 σε καλλιέργειες φυσιολογικών κυττάρων αρθρικού υμένα και κυττάρων αρθρικού υμένα ασθενών με λοίμωξη από το στέλεχος <i>Staphylococcus aureus</i>	62
B.2.5. Μελέτη της σχετικής έκφρασης του miR-125b σε καλλιέργειες φυσιολογικών κυττάρων αρθρικού υμένα και κυττάρων αρθρικού υμένα ασθενών με λοίμωξη από το στέλεχος <i>Staphylococcus aureus</i>	62
B.2.6. Μελέτη της σχετικής έκφρασης του miR-19a, σε ορό υγιών ατόμων και σε ορό ασθενών με λοίμωξη από το στέλεχος <i>Staphylococcus aureus</i>	63

B.2.7. Μελέτη της σχετικής έκφρασης του miR-19b, σε ορό υγιών ατόμων και σε ορό ασθενών με λοίμωξη από το στέλεχος <i>Staphylococcus aureus</i>	63
B.2.8. Μελέτη της σχετικής έκφρασης του miR-16, σε ορό υγιών ατόμων και σε ορό ασθενών με λοίμωξη από το στέλεχος <i>Staphylococcus aureus</i>	64
B.2.9. Μελέτη της σχετικής έκφρασης του miR-21, σε ορό υγιών ατόμων και σε ορό ασθενών με λοίμωξη από το στέλεχος <i>Staphylococcus aureus</i>	64
B.2.10. Μελέτη της σχετικής έκφρασης του miR-125b, σε ορό υγιών ατόμων και σε ορό ασθενών με λοίμωξη από το στέλεχος <i>Staphylococcus aureus</i>	65
B.2.11. Μελέτη της σχετικής έκφρασης των miR-223 και miR-365, σε ορό υγιών ατόμων και σε ορό ασθενών με λοίμωξη από το στέλεχος <i>Staphylococcus aureus</i>	65
B.2.12. Βιοπληροφορική ανάλυση.....	66
B.3. Συζήτηση.....	70
Βιβλιογραφία.....	76

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η σηπτική αρθρίτιδα ανήκει στις λοιμώξεις του μυοσκελετικού συστήματος, και επιπροσθέτως, αποτελεί μία φλεγμονώδη ασθένεια των αρθρώσεων. Οι λοιμώξεις των περιπροθετικών αρθρώσεων χαρακτηρίζονται από φλεγμονώδη καταστροφή των αρθρώσεων, επίσης. Ο κυριότερος παθογόνος μικροοργανισμός είναι το *Staphylococcus aureus*. Οι υποδοχείς Toll-like (TLRs) αναγνωρίζουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς και ενεργοποιούν σηματοδοτικά μονοπάτια της φλεγμονής από τα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας. Τα ενδοκυτταρικά microRNAs ρυθμίζουν τη διεξαγωγή των σηματοδοτικών καταρρακτών της φλεγμονής που επάγονται από τους TLRs. Πρόσφατες έρευνες, κατέδειξαν την παρουσία εξωκυττάρων microRNAs σε βιολογικά υγρά. Τα ενδοκυτταρικά miR-21, miR-16, miR-125b, miR-19a, miR-19b, miR-223 και miR-365, ρυθμίζουν την έκβαση λοιμωδών ασθενειών. Επίσης, η μεταβολή των επιπέδων αυτών των microRNAs στον ορό, μπορεί να εφαρμοστεί ως βιοδείκτης εντοπισμού λοιμώξεων. Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν η διερεύνηση του ενδεχομένου, τα ανωτέρω miRNAs να αποτελέσουν προγνωστικούς βιοδείκτες περιπροθετικών λοιμώξεων από το *S. aureus*.

Για τη διεκπεραίωση της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δείγματα δύο ομάδων ατόμων που νοσηλεύτηκαν στην Ορθοπαιδική Κλινική του ΠΓΝΛ. Την ομάδα μελέτης αποτέλεσαν δείγματα ορού και αρθρικού υμένα, ατόμων που εκδήλωσαν περιπροθετική λοίμωξη από το *S. aureus*, ύστερα από ολική αρθροπλαστική (n=20) και την ομάδα ελέγχου, δείγματα ορού και αρθρικού υμένα, ατόμων χωρίς λοίμωξη (n=6). Τα επίπεδα έκφρασης των microRNAs προσδιορίστηκαν με Real-time PCR. Με το DIANA mirPath πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση προκειμένου να προσδιοριστεί η βιολογική σημασία γονιδίων-στόχων των microRNAs.

Παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης των miR-21, miR-16, miR-125b, miR-19a και miR-19b στα δείγματα ορού και υμενοκυττάρων των ατόμων με λοίμωξη, συγκριτικά με την έκφρασή τους στα δείγματα των υγιών. Στη βιοπληροφορική ανάλυση, προσδιορίστηκαν γονίδια-στόχοι των συγκεκριμένων microRNAs, που εμπλέκονται σε μονοπάτια σχετιζόμενα με τη φλεγμονή.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι, τα miR-21, miR-16, miR-125b, miR-19a και miR-19b εμπλέκονται στην παθολογία περιπροθετικών λοιμώξεων από το *S. aureus* και ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες αυτών, καθώς και των λοιμώξεων του μυοσκελετικού συστήματος.

ABSTRACT

Septic arthritis is a musculoskeletal infection and an inflammatory joint disease. Periprosthetic joint infections are characterized by joint inflammatory deterioration as well. *S. aureus* is the most common causative pathogen. Toll-like Receptors (TLRs) are responsible for the innate immune responses via the recognition of the pathogens and the induction of inflammatory signaling pathways. Intracellular microRNAs regulate the integration of the TLR-induced inflammatory signaling pathways. Recent studies, have shown the presence of extracellular microRNAs in various biological fluids. Intracellular miR-21, miR-16, miR-125b, miR-19a, miR-19b, miR-223 and miR-365 regulate the outcome of infectious diseases and the serum expression profile alteration of these microRNAs can be used as infectious disease biomarker. The aim of this study was to investigate the possibility of the above microRNAs to be prognostic biomarkers of periprosthetic joint infections by *S. aureus*.

In the present study, 20 articular synovium and serum samples have been obtained from patients undergoing replacement surgery who have presented periprosthetic joint infection by *S. aureus*, as well as 6 normal articular synovium and serum samples from individuals undergoing replacement, with no history of periprosthetic joint infection, in collaboration with the Orthopaedic Department of UHL. The microRNAs expression profiles were assessed by real-time PCR. Moreover, in order to specify the biological function of microRNAs target genes, the DIANA mirPath bioinformatic tool was used.

Our results showed that the expression levels of miR-21, miR-16, miR-125b, miR-19a and miR-19b were upregulated in both infected serum samples and synovium cell samples compared to normal samples. Bioinformatic analysis showed that the microRNAs target genes contribute to the function of inflammatory signaling pathways.

In conclusion, the results of the present study indicate that the above microRNAs are involved in periprosthetic joint infections by *S. aureus* pathogenesis and they can also be used as prognostic biomarkers, not only attributed to these infections but in addition musculoskeletal infections.

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A.1. Εισαγωγή

Οι λοιμώξεις του μυοσκελετικού συστήματος είναι ασυνήθεις, αλλά δυνητικά θανατηφόρες καταστάσεις έκτακτης ανάγκης, οι οποίες συνδέονται με σημαντική θνησιμότητα και νοσηρότητα. (Miriam García-Arias, 2011) Οι κυριότερες λοιμώξεις του μυοσκελετικού συστήματος είναι οι εξής: Σηπτική αρθρίτιδα (Miriam García-Arias, 2011), Οστεομυελίτιδα (Daniel P Lew, 2004), Δισκίτιδα και Σπονδυλοδισκίτιδα (Principi N, 2016) και Λοιμώξεις των μαλακών ιστών (Tsaï YH, 2009) Επίσης, ως αιτίες λοίμωξης του μυοσκελετικού, πρέπει να συνυπολογιστούν και οι μετατραυματικές, όπως και οι μεταχειρουργικές λοιμώξεις. (Cook GE, 2015) Ως εκ τούτου, η πρόγνωση, η έγκαιρη διάγνωση, καθώς και η άμεση και αποτελεσματική θεραπεία, είναι απαραίτητες ενέργειες για την αποφυγή δυσάρεστων εκβάσεων στην επιβίωση των ασθενών. (Miriam García-Arias, 2011)

A.1.1. Παθογένεση των αρθρώσεων στις λοιμώξεις του μυοσκελετικού συστήματος

Ο αρθρικός υμένας είναι μία δομή με καλή αγγειακή υποστήριξη, χωρίς όμως τον περιορισμό της βασικής μεμβράνης, και επομένως, επιτρέπει την εύκολη πρόσβαση των βακτηρίων σε αυτόν. (Goldenberg DL, 1998) Από τη στιγμή που τα βακτήρια θα καταφθάσουν στην περιοχή της άρθρωσης, το περιβάλλον θα επιτρέψει την προσκόλλησή τους και την επακόλουθη μόλυνση του αρθρικού ιστού. (Miriam García-Arias, 2011)

Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί προσβάλλουν τις αρθρώσεις κυρίως με τέσσερις τρόπους:

- ❖ Μέσω της κυκλοφορίας του αίματος (αιματογενώς)
- ❖ Μέσω παραπλήσιων μολυσματικών εστιών
- ❖ Εξαιτίας της σήψης παρακείμενων μαλακών ιστών
- ❖ Με άμεση εισβολή από ενδεχόμενους τραυματισμούς

(Miriam García-Arias, 2011)

A.1.2. Προδιαθεσικοί παράγοντες

Οι κυριότεροι προδιαθεσικοί παράγοντες για την εκδήλωση λοιμώξεων του μυοσκελετικού συστήματος είναι οι εξής:

- ❖ Διάφορες ασθένειες των αρθρώσεων
- ❖ Θεραπείες που οδηγούν άμεσα σε καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος
- ❖ Λοίμωξη από τον ιό HIV

- ❖ Χρήση γλυκοκορτικοειδών
- ❖ Χρήση αντι-ρευματικών φαρμάκων
- ❖ Χειρουργικές επεμβάσεις
- ❖ Τραυματισμοί
- ❖ Προσθετικές αρθρώσεις
- ❖ Ηλικία

(Miriam García-Arias, 2011)

A.2. Ο ρόλος της γενετικής και της επιγενετικής στην παθογένεση των ασθενειών

Οι μελέτες GWAS (Genome-wide association studies) έχουν ταυτοποιήσει πληθώρα γενετικών τόπων, οι οποίοι σχετίζονται με την εκδήλωση διαφόρων ασθενειών, όπως ο διαβήτης τύπου I, ο διαβήτης τύπου II και η ρευματοειδής αρθρίτιδα. (Burton PR, 2007; Lettre G, 2008; Barrett JC, 2009; Todd JA, 2010) Οι έρευνες αυτές, έχουν αποδείξει ότι, συγκεκριμένοι κοινοί μονο-νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) σχετίζονται με την εμφάνιση ασθενειών. Ωστόσο, η ακριβής κατανόηση του τρόπου, με τον οποίο αυτές οι ποικιλομορφίες της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας συμβάλλουν στην εξέλιξη των ασθενειών, αποτελεί μεγάλη πρόκληση για την επιστημονική κοινότητα. (Leung A, 2012)

A.2.1. Η έννοια των μονο-νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών

Οι μονο-νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί αποτελούν ποικιλομορφίες στην αλληλουχία του DNA, οι οποίες πραγματοποιούνται όταν στη DNA αλληλουχία μεταβάλλεται μία μεμονωμένη νουκλεοτιδική βάση. Ορισμένοι SNPs, γνωστοί ως «συνώνυμοι πολυμορφισμοί», δε συντελούν στην αλλαγή κάποιου αμινοξέος της παραγόμενης πρωτεΐνης, εξαιτίας της τάσης του γενετικού κώδικα να μειώνει τις πιθανότητες να συμβεί μία αμινοξική αλλαγή. Σε άλλες περιπτώσεις (μη-συνώνυμοι SNPs), οι πολυμορφισμοί επιφέρουν αμινοξική αλλαγή στην κωδικοποιούμενη πρωτεΐνη, γεγονός, το οποίο μπορεί να επηρεάσει ή και να μην επηρεάσει την πρωτεϊνική δομή ή λειτουργία. (C. Skevaki, 2015) Από την άλλη πλευρά, πολλοί από τους αναλυθέντες SNPs που σχετίζονται με την εκδήλωση ασθενειών, έχουν εντοπιστεί σε περιοχές του γονιδιώματος, οι οποίες δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες (Hindorff LA, 2009), γεγονός, το οποίο δυσχεραίνει τη διαλεύκανση των λειτουργικών επιπτώσεων που η παρουσία τους επιφέρει. (Leung A, 2012)

A.2.2. Η έννοια των επιγενετικών τροποποιήσεων

Η αλληλεπίδραση μεταξύ της αλληλουχίας του DNA και των πρωτεϊνών, μπορεί να διαταραχθεί από ενδεχόμενες τροποποιήσεις μεμονωμένων στοιχείων των νουκλεοσωμάτων. Οι τροποποιήσεις αυτές, μπορεί να έχουν επίπτωση στο βαθμό προσβασιμότητας της χρωματίνης, στην πρόσδεση ρυθμιστικών παραγόντων σε αυτή ή/και στις, μεγάλου νουκλεοτιδικού εύρους, αλληλεπιδράσεις της χρωματίνης. (Bell O, 2011) Το γενωμικό προφίλ όλων των επιγενετικών φαινομένων σε ένα δεδομένο κύτταρο, αναφέρεται ως, το επιγένωμα του κυττάρου αυτού. Αξίζει να σημειωθεί ότι, ενώ τα κύτταρα έχουν το ίδιο γένωμα, το είδος του επιγενώματος του κάθε κυττάρου εξαρτάται από το ίδιο το κύτταρο και μπορεί να μεταβληθεί, αποκρινόμενο σε ενδογενή και εξωγενή ερεθίσματα. (Leung A, 2012)

A.2.2.1. Η μεθυλίωση του DNA

Η μεθυλίωση αποτελεί την καλύτερα μελετημένη επιγενετική τροποποίηση του DNA, η οποία, στους ανθρώπους, συναντάται κυρίως σε περιοχές του γονιδιώματος με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες δινουκλεοτιδίων κυτοσίνης και γουανίνης (CpG dinucleotides). (Leung A, 2012) Στα θηλαστικά, ρυθμιζόμενη από τις DNA μεθυλοτρανσφεράσες, η μεθυλίωση του DNA είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και για τον καθορισμό αποφάσεων που συνδέονται άμεσα με την επιβίωση του κυττάρου, (Reik W, 2007) καθώς εμπλέκεται στενά στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (Cedar H, 2012). Επιπλέον, η διαταραχή της μεθυλίωσης του DNA έχει συσχετιστεί και με την εξέλιξη των ασθενειών. (Baylin SB, 2011)

A.2.2.2. Η τροποποίηση των ιστονών

Επιπροσθέτως της επιγενετικής τροποποίησης των νουκλεοτιδίων της DNA αλληλουχίας, ανάλογες τροποποιήσεις επισυμβαίνουν και στις ιστόνες των νουκλεοσωμάτων. Αυτές οι μετα-μεταφραστικές αλλαγές, συμπεριλαμβανομένης, μεταξύ άλλων, της ακετυλίωσης, της μεθυλίωσης, της φωσφορυλίωσης και της ουβικουιτινίωσης, εξαρτώνται από ενζυμικά σύμπλοκα που αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένες θέσεις του γονιδιώματος. (Leung A, 2012) Η απορρύθμιση των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των ιστονών, συνεπάγεται τη μεταβολή της γονιδιακής έκφρασης, καθώς και την προώθηση της ανάπτυξης ασθενειών. (Russo VEA, 1996; Kouzarides T, 2007) Επιπλέον, η διαταραχή της λειτουργίας των ίδιων των τροποποιητικών ενζύμων των ιστονών, μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στις ανθρώπινες ασθένειες και στη γονιδιακή έκφραση. (Krivtsov AV, 2007) Αξίζει να σημειωθεί ότι, οι ενζυμικοί τροποποιητές των ιστονών ρυθμίζονται και από τη δράση

μη κωδικών RNAs. (Broadbent HM, 2008; Cunnington MS, 2010; Kotake Y, 2011; Pasmant E, 2011; Yap KL, 2010)

A.2.3. Σύνδεση μεταξύ μεθυλίωσης του DNA και μονο-νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών, σχετιζόμενων, με την εκδήλωση ασθενειών

Τα τελευταία χρόνια, η επιστημονική κοινότητα επιδίδεται στην εκτίμηση του τρόπου, με τον οποίο οι διάφοροι γενετικοί πολυμορφισμοί επιδρούν στα επιγενετικά φαινόμενα. (Leung A, 2012) Η επιστημονική ομάδα του Kerkel και των συνεργατών του, ανέλυσε σε ανθρώπινους ιστούς, τη μεθυλίωση του DNA σε περιοχές μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών, (Kerkel K, 2008) αποδεικνύοντας την δυνατότητα των πολυμορφισμών να επηρεάζουν το προφίλ μεθυλίωσης περιοχών του γονιδιώματος, σε τοπικό επίπεδο, και τελικά, τη ρύθμιση της εκφρασης παρακείμενων γονιδίων. (Leung A, 2012) Επίσης, αποδείχτηκε η σύνδεση μεταξύ της κατάστασης ετεροζυγωτίας σε SNPs και των διαφορών στη μεθυλίωση του DNA, μεταξύ συγγενικών, (Gertz J, 2011) αλλά και μη συγγενικών ατόμων, γεγονός, το οποίο προτείνει ότι, ο γονότυπος επιδρά σε αυτές τις κληρονομήσιμες περιοχές διαφοροποιημένης μεθυλίωσης. (Leung A, 2012) Για παράδειγμα, η ερευνητική ομάδα του Bell και των συνεργατών του, ταυτοποίησε μία περιοχή διαφοροποιημένης μεθυλίωσης, η οποία περιείχε SNPs σχετιζόμενα με την ασθένεια του διαβήτη τύπου 2, και βρισκόταν πλησίον του γονιδίου FTO, ευρέως γνωστό για την εμπλοκή του στο διαβήτη και στην παχυσαρκία. (Bell CG, 2010)

A.2.4. Σύνδεση μεταξύ προσβασιμότητας της χρωματίνης, μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των ιστονών και μονο-νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών, σχετιζόμενων, με την εκδήλωση ασθενειών

Επί του παρόντος, υπάρχει επαρκής όγκος δεδομένων σχετικά με το ότι, η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης αποτελεί ένα απαραίτητο βήμα, προκειμένου να καταστεί εφικτή η πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA. (Leung A, 2012) Ενώ κάποιοι παράγοντες έχουν την δυνατότητα απευθείας πρόσδεσης στα νουκλεοσώματα και επακόλουθης πρόσβασης στην υποκείμενη DNA αλληλουχία, άλλοι παράγοντες απαιτούν μεσολαβητές αναμόρφωσης της χρωματίνης. (Hu G, 2011) Περαιτέρω, τόσο η πρόσδεση των πρωτεϊνών στο DNA, όσο και ο βαθμός προσβασιμότητας της χρωματίνης, σχετίζονται με διακριτά αλληλία. (Leung A, 2012) Η ανάλυση του προφίλ πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων, αποκάλυψε την ποικιλομορφία των γενετικών περιοχών από άτομο σε άτομο, οι οποίες προσφέρονται για την πρόσδεσή τους. (Leung A, 2012) Για παράδειγμα, επτά (7) έως δέκα (10) τοις εκατό (7-10%) των περιοχών πρόσδεσης

του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, ο οποίος αποτελεί μια πρωτεΐνη με σημαντική επιρροή στη ρύθμιση της φλεγμονής και των αυτοάνοσων ασθενειών, αποδείχτηκε ότι διαφέρουν μεταξύ των ατόμων, όπως και ότι πολλές από αυτές περιέχουν πολυμορφισμούς. (Kasowski M, 2010) Επίσης, ενώ οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί αυτών των περιοχών επιδρούν στην πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων σε αυτές, πολυμορφισμοί της ίδιας κατηγορίας, οι οποίοι εδράζονται εκτός της περιοχής πρόσδεσης, έχουν συνδεθεί και αυτοί με τη διαταραχή της πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων. (Reddy TE, 2012)

Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στην προσβασιμότητα της χρωματίνης και στους γενετικούς πολυμορφισμούς, είναι πολύ σημαντική για την εκδήλωση αυτοάνοσων ασθενειών. (Leung A, 2012) Κοινός μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός στην χρωμοσωμική περιοχή 17q12-q21, έχουν συσχετιστεί με πολλές αυτοάνοσες διαταραχές. (Barrett JC, 2009; Barrett JC, 2008; Moffatt MF, 2007) Η ανάλυση αυτής της περιοχής αποκάλυψε τη σχέση μεταξύ της γονιδιακής έκφρασης και της ύπαρξης διακριτών αλληλίων, και οδήγησε, κατά συνέπεια, στον εντοπισμό ενός μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού σχετιζόμενου με αυτοάνοσες ασθένειες, ο οποίος επηρεάζει την πρόσδεση του μεταγραφικού παράγοντα CTCF και την προσβασιμότητα της υποκείμενης γονιδιακής αλληλουχίας. (Verlaan DJ, 2009) Επίσης, η περιοχή του γονιδίου CLEC16A, περιέχει πολλούς μονο-νουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς που συνδέονται με την εκδήλωση αυτοάνοσων διαταραχών, με αρκετούς από αυτούς να εντοπίζονται στο εσωτερικό της αλληλουχίας του εσωνίου 19. (Davison LJ, 2012)

A.2.5. Οι μονο-νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί στους TLRs σχετίζονται με την ευαισθησία ενός ατόμου έναντι μιας λοιμώδους ασθένειας

Οι περισσότεροι ζωντανοί οργανισμοί έχουν αναπτύξει αποτελεσματικούς μηχανισμούς άμυνας, οι οποίοι τους προστατεύουν από ενδεχόμενη εισβολή παθογόνων μικροοργανισμών. Αυτοί οι αμυντικοί μηχανισμοί συνιστούν μία φυλογενετικά συντηρημένη ανοσία, γνωστή ως έμφυτη ανοσία. (Medzhitov R, 1997) Η έμφυτη ανοσία έχει ύψιστη σημασία στην αρχική αναγνώριση του εισβάλλοντος παθογόνου οργανισμού, συμβάλλοντας, κατ' αυτόν τον τρόπο, καθοριστικά στην κατάλληλη αντίδραση του ξενιστή, ώστε να ελεγχθεί η λοίμωξη. Πολύ συχνά, η απόκριση της έμφυτης ανοσίας συνδέεται άμεσα με την επιβίωση του οργανισμού, καθώς η καθυστερημένη απόκριση στην εισβολή των παθογόνων μπορεί να επιφέρει εξαιρετικά δυσμενή λοίμωξη, επικίνδυνη καταστροφή των ιστών, δυσλειτουργία οργάνων και θάνατο. Η αναγνώριση των παθογόνων μικροοργανισμών από το σύστημα της έμφυτης ανοσίας, βασίζεται στην αλληλεπίδραση συγκεκριμένων

υποδοχέων της επιφάνειας των κυττάρων (Pattern recognition receptors, PRRs), με εξελικτικά συντηρημένες δομές των παθογόνων που ονομάζονται «μοριακά πρότυπα σχετιζόμενα με παθογόνα (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)». (C. Skevaki, 2015)

Οι υποδοχείς Toll-like (Toll-like receptors, TLRs) αποτελούν την καλύτερα μελετημένη ομάδα υποδοχέων PRRs, των οποίων η λειτουργία είναι η ταχύτατη αναγνώριση των PAMPs που προέρχονται από τους εισβάλλοντες παθογόνους μικροοργανισμούς. Μετά την πρόσδεσή τους με τα μοριακά αυτά συστατικά, οι TLRs πυροδοτούν προ-φλεγμονώδεις και αντι-μικροβιακές αποκρίσεις, διαδραματίζοντας, συνεπώς, κεντρικό ρόλο στην πρώτη γραμμή άμυνας έναντι των παθογόνων, και επιπλέον, στην προώθηση της προσαρμοστικής ανοσιακής απόκρισης. Οι SNPs στους TLRs επιδρούν στην ευαισθησία ενός μεμονωμένου ατόμου απέναντι σε μία λοιμώδη ασθένεια, και ως εκ τούτου, η μελέτη της λειτουργίας των πολυμορφισμών των αλληλίων, μπορεί να οδηγήσει στην καλύτερη κατανόηση των παθοφυσιολογικών διεργασιών. (C. Skevaki, 2015)

A.2.5.1. Μονο-νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί στον TLR2

Εξαιτίας της ικανότητας του TLR2 να αλληλεπιδρά με κατά gram θετικά βακτήρια και μυκοβακτήρια (Lien E, 1999; Means TK, 1999; Doyle SL, 2006), αρκετές έρευνες επικεντρώθηκαν στην εκτίμηση της επίπτωσης της παρουσίας SNPs στον TLR2, σχετικά με την ευαισθησία σε λοιμώξεις από αυτά τα παθογόνα.

Ο πολυμορφισμός G2258A, ο οποίος προκαλεί μειωμένη σηματοδοτική απόκριση του TLR2 έναντι των βακτηριακών λιποπεπτιδίων, έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης ασυμπτωματικής βακτηριουρίας στο γυναικείο πληθυσμό. (Hawn TR, 2009)

Επίσης, οι πολυμορφισμοί R688W και R753Q, έχουν μελετηθεί επισταμένως και τα αποτελέσματα των ερευνών έδειξαν σημαντική συσχέτισή τους με την παρουσία διαφόρων λοιμωδών ασθενειών. Ο πολυμορφισμός R753Q αποτελεί έναν παράγοντα κινδύνου για την πρόκληση λοίμωξης από τον CMV (Cytomegalovirus), μετά από περιστατικά μεταμόσχευσης ήπατος (Kijpittayarit S, 2007; Kang SH, 2012), για το ρινοφαρυγγικό βακτηριακό αποικισμό σε βρέφη (Vuononvirta J, 2011) και για υψηλότερα ποσοστά υποτροπιασμού λοιμώξεων, καθώς και για την εκδήλωση του αρχικού σηπτικού σοκ σε δέκτες ηπατικών μοσχευμάτων, οι οποίοι αναπτύσσουν λοιμώξεις από κατά gram θετικά βακτήρια. (Lee SO, 2011)

Άλλοι πολυμορφισμοί του TLR2, όπως, για παράδειγμα, ο μονο-νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός P631H και οι μικρο-δορυφορικοί πολυμορφισμοί στην αλληλουχία του εσωνίου 2, εμφάνισαν σημαντικά αυξημένη παρουσία σε ασθενείς με σήψη, γεγονός,

το οποίο προτείνει τη συσχέτιση της παρουσίας τους με τον αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης της εν λόγω λοίμωξης. (Yim JJ, 2006; Etokebe GE, 2010)

A.2.5.2. Μονο-νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί στον TLR4

Μονο-νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί στην κωδική περιοχή, καθώς και σε αυτή του υποκινητή του TLR4, έχουν συσχετιστεί με την αυξημένη επίπτωση συγκεκριμένων λοιμωδών και φλεγμονωδών ασθενειών, όπως οι λοιμώξεις από κατά gram θετικά βακτήρια (Agnese DM, 2002) και η σήψη (Lorenz E, 2002a). Αντιθέτως, η παρουσία τους έχει συνδεθεί με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης ρευματοειδούς αρθρίτιδας. (Radstake TR, 2004)

Η παρουσία του πολυμορφισμού D299G συνδέεται με τη μειωμένη παραγωγή κυτοκινών από τα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος και των κυψελιδικών μακροφάγων, ως απόκριση στο βακτηριακό λιποπολυσακχαρίτη (Lipopolysaccharide, LPS) (Arbour NC, 2000), με την αυξημένη επίπτωση της βακτηριαιμίας από κατά gram αρνητικά βακτήρια (Agnese DM, 2002), όπως και με τη σήψη (Agnese DM, 2002; Lorenz E, 2002b). Επιπλέον, ο πολυμορφισμός D299G, καθώς και ο T399I, έχουν συσχετιστεί με τη σήψη (Lorenz 2002b, Barber RC, 2004; Barber RC, 2006), την ισχυρή μορφή λοίμωξης από τον RSV (Respiratory Syncytial Virus) (Awomoyi AA, 2007; Tal G, 2004) και τη λοίμωξη από το βακτήριο M. Tuberculosis. (Ferwerda B, 2007). Αν και η παρουσία αυτών των πολυμορφισμών στον TLR4 έχει συσχετιστεί με την ευαισθησία σε διάφορες λοιμώδεις ασθένειες, σε επιλεγμένες ομάδες ασθενών, από την άλλη πλευρά, έχει παρατηρηθεί ότι μειώνουν την ευαισθησία στη ρευματοειδή αρθρίτιδα. (Kiechl S, 2002b)

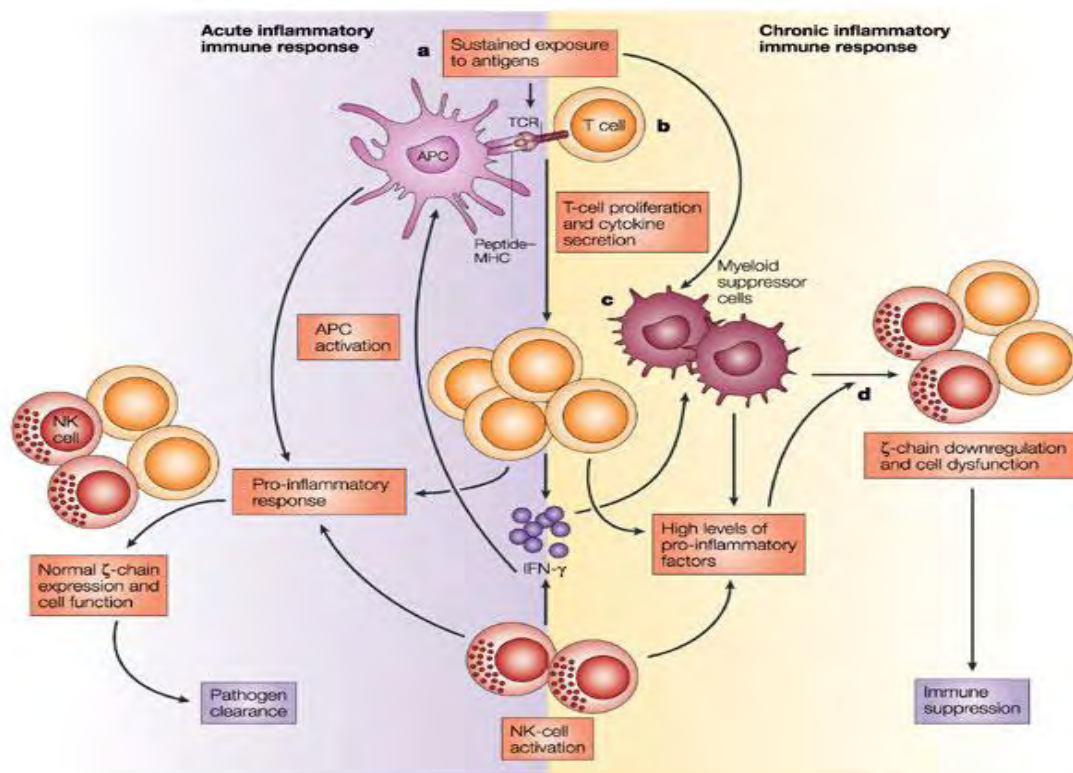
A.2.6. Η κατανόηση των ανοσιακών μηχανισμών αποτελεί προϋπόθεση για τη βελτίωση της ποιότητας ζωής

Όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, η εκδήλωση μιας ασθένειας δεν εξαρτάται αποκλειστικά από την παρουσία/απουσία συγκεκριμένων SNPs, αλλά και από την επιπρόσθετη αλληλεπίδραση μεταξύ διαφόρων γενετικών, επιγενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Συνεπώς, οι έρευνες θα πρέπει να στραφούν και προς την κατεύθυνση της χαρτογράφησης και άλλων περιοχών του γονιδιώματος, όπως οι αλληλουχίες ιντρονίων, ρυθμιστικών στοιχείων, καθώς και η διαλεύκανση της εμπλοκής ποικίλων επιγενετικών μηχανισμών, όπως τα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA, οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών και τα μη κωδικά RNA μόρια. Συνεπώς, δεδομένου ότι, οι TLRs συνεργάζονται και με άλλους υποδοχείς και μόρια προκειμένου να επιτελέσουν τη λειτουργία τους, η ακριβής κατανόηση των μηχανισμών που ενέχονται στην απόκριση της έμφυτης και της προσαρμοστικής

ανοσίας, αποτελεί προϋπόθεση για την προσπάθεια ανάπτυξης νέων θεραπευτικών στρατηγικών και θεραπευτικών μέσων, τα οποία θα συντελέσουν στην αποτελεσματική ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και, τελικά, θα βελτιώσουν την ποιότητα της ανθρώπινης ζωής. (C. Skevaki, 2015)

A.3. Επισκόπηση της φλεγμονώδους απόκρισης

Η φλεγμονή διαδραματίζει καίριο ρόλο στην άμυνα του ξενιστή απέναντι σε εισβάλλοντες παθογόνους μικροοργανισμούς, και επίσης, είναι απαραίτητη για την επιτυχή αναμόρφωση των προσβεβλημένων ιστών. Κύτταρα της μυελοειδούς σειράς, όπως τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα, έχουν τη δυνατότητα αναγνώρισης μοριακών προτύπων των παθογόνων (Pathogen associated molecular patterns, PAMPs) και μοριακών προτύπων κατεστραμμένων ιστών (Damage associated molecular patterns, DAMPs), τα οποία βρίσκονται στα μικροβιακά παθογόνα ή απελευθερώνονται ως κυτταρικά συστατικά κατεστραμμένων



Nature Reviews | Immunology

Εικόνα 1. Τα βασικά γεγονότα της φλεγμονώδους απόκρισης

ιστών, αντίστοιχα. Η πρόσδεση των PAMPs ή DAMPs σε εξειδικευμένους υποδοχείς

της μεμβράνης των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως, για παράδειγμα, οι TLRs (Toll-like receptors), NLRs (Nod-like receptors) και RAGE (Receptor for advanced glycation endproducts) ή σε ενδοκυτταρικούς υποδοχείς των κυττάρων αυτών, έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη ενός καταρράκτη μοριακών γεγονότων, ο οποίος οδηγεί στην παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, χημοκινών, δραστικών ριζών οξυγόνου και αντιμικροβιακών πεπτιδίων, καθώς και στην ενίσχυση της δράσης των φαγοκυττάρων. Αυτά τα σηματοδοτικά γεγονότα είναι απαραίτητα για τον τερματισμό της λοίμωξης και την ταχεία εκκαθάριση των κυτταρικών υπολειμμάτων στους προσβεβλημένους ιστούς. (Takeuchi O, 2010; Kawai T, 2010; Medzhitov R, 2009; Jeannin P, 2008) Η επιτυχής ενορχήστρωση της φλεγμονώδους διεργασίας είναι, επίσης, σημαντική και για την ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων και την επακόλουθη ανάπτυξη της προσαρμοστικής ανοσίας. (Mills KH, 2011)

Ωστόσο, παρά τα οφέλη της φλεγμονής στην προστασία του ξενιστή από εξωγενούς και ενδογενούς φύσης προσβολές, άκαιρη ή/και αδικαιολόγητα υψηλού βαθμού φλεγμονή μπορεί να προκαλέσει βλάβη των ιστών του ξενιστή. Ως εκ τούτου, τα μοριακά δίκτυα που ελέγχουν την έναρξη, την ένταση και την επίλυση της φλεγμονώδους απόκρισης, θα πρέπει να είναι κατάλληλα ρυθμισμένα, προκειμένου να διατηρηθεί η ομοιόσταση και η βελτιστοποίηση της ανοσιακής απόκρισης του ξενιστή. (O'Connell RM, 2012) Συνεπώς, είναι ξεκάθαρο ότι, κάθε στάδιο της φλεγμονώδους διεργασίας υπόκειται σε θετικό, αλλά και σε αρνητικό ρυθμιστικό έλεγχο, με σκοπό να επιτευχθεί η ιδανική απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος. (Medzhitov R, 2009; Ruland J, 2011)

A.4. Σηπτική αρθρίτιδα

A.4.1. Εισαγωγή

Η σηπτική αρθρίτιδα, γνωστή και ως λοιμώδης αρθρίτιδα, αποτελεί μία φλεγμονώδη ασθένεια των αρθρώσεων. Τυπικά, η σηπτική αρθρίτιδα εμπλέκει μία μεγάλη άρθρωση, όπως το γόνατο ή το ισχίο, αλλά είναι σε θέση να επηρεάσει οποιονδήποτε τύπο άρθρωσης. (P. Colavite, 2014) Η γενική εκτιμώμενη επίπτωση της ασθένειας σε βιομηχανοποιημένες χώρες, είναι περίπου έξι (6) περιστατικά ανά εκατό χιλιάδες (100,000) άτομα, κάθε χρόνο, με τα υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης να εντοπίζονται στις ηλικιακές ομάδες κάτω των δεκαπέντε (15) και άνω των πενήντα πέντε (55) ετών. (Nade S, 2003) Οι σημαντικότεροι παράγοντες κινδύνου για την εκδήλωση της σηπτικής αρθρίτιδας, είναι οι προϋπάρχουσες παθολογικές καταστάσεις των αρθρώσεων και ιδιαίτερα η παρουσία ρευματοειδούς αρθρίτιδας ή οι χειρουργικές

επεμβάσεις εμφύτευσης προσθετικών αρθρώσεων. (P. Colavite, 2014) Σ' αυτούς τους ασθενείς, η επίπτωση της σηπτικής αρθρίτιδας αυξάνει σε εβδομήντα (70) ανά εκατό χιλιάδες (100,000) άτομα το χρόνο. (Kaandorp CJ, 1995) Η συγκεκριμένη ασθένεια, γενικά, θεωρείται ως δευτερογενής λοίμωξη, και στην περίπτωση αυτή, εκδηλώνεται όταν τα υπεύθυνα για τη λοίμωξη βακτήρια, δραπέτεύουν από την αιματική κυκλοφορία και εισέρχονται στους περιβάλλοντες ιστούς ή μολύνουν την περιοχή της άρθρωσης μετά από μία χειρουργική επέμβαση, με τελικό αποτέλεσμα, και στις δύο περιπτώσεις, την καταστροφή του αρθρικού χόνδρου. (Goldenberg DL, 1985)

Δεδομένου ότι, ακόμη και μετά την εκκαθάριση των ιστών της άρθρωσης από τους λοιμογόνους παράγοντες, η αρθρική καταστροφή συνεχίζει να εξελίσσεται, εξάγεται το συμπέρασμα της συμμετοχής επιπρόσθετων αποδομητικών μεσολαβητών. Συνεπώς, προδιαθεσικοί παράγοντες που σχετίζονται με τον ξενιστή, καθώς και με το παθογόνο βακτήριο, θεωρούνται εξέχουσας σημασίας στην παθολογία της σηπτικής αρθρίτιδας. (P. Colavite, 2014) Η αρχική εστίαση της αρθρικής καταστροφής, συνήθως, παρατηρείται στο σημείο ένωσης του αρθρικού χόνδρου και του υμένα, με τελικό αποτέλεσμα την καταστροφή του χόνδρου και του οστού. Η φλεγμονώδης διεργασία χαρακτηρίζεται από μία ταχεία κινητοποίηση πολυμορφοπύρηνων κοκκιοκυττάρων και ενεργοποιημένων μακροφάγων, που σύντομα ακολουθείται από την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων. (Bremell T, 1992; Verdrengh M, 2006) Αυτή η διαδικασία, τελικά, οδηγεί σε μη αναστρέψιμη απώλεια της αρθρικής λειτουργίας και συνδέεται με την παραγωγή μίας ποικιλίας κυτοκινών. (Kong YY, 1999; Campagnuolo G, 2002) Ως εκ τούτου, η ταχύτητα και η ακρίβεια της θεραπείας είναι καίριας σημασίας για την έκβαση της σηπτικής αρθρίτιδας. Η καθυστερημένη θεραπεία, ακόμη και λίγων ημερών, μπορεί να συντελέσει σε μόνιμη καταστροφή της άρθρωσης και αυξημένο κίνδυνο θνησιμότητας.

A.4.2. Οι κυριότεροι μικροβιακοί παράγοντες κινδύνου εμφάνισης της σηπτικής αρθρίτιδας

Ο συνηθέστερος αιτιώδης μικροοργανισμός για την πρόκληση σηπτικής αρθρίτιδας, τόσο σε ενήλικες, όσο και σε παιδιά, είναι το βακτήριο *Staphylococcus aureus*. (Clerc O, 2011; Howard-Jones AR, 2013) Το βακτήριο αυτό, αποτελεί την πρωταρχική αιτία βακτηριακής αρθρίτιδας στο σαράντα τοις εκατό (40%) των περιπτώσεων στην Αγγλία και στη Σκωτία, στο πενήντα έξι τοις εκατό (56%) στη Γαλλία και στο τριάντα επτά τοις εκατό (37%) στην Αυστραλία. (Le Dantec L, 1996; Ryan MJ, 1997) Είναι ενδιαφέρον ότι, η πιθανότητα απομόνωσης του *S. aureus* από περιοχές αλλοιωμένων αρθρώσεων, αυξάνει σε ογδόντα τοις εκατό (80%) σε περιστατικά αρθρικών λοιμώξεων, ασθενών με ταυτόχρονη παρουσία ρευματοειδούς

αρθρίτιδας και ασθενών με διαβήτη. (P. Colavite, 2014) Το γεγονός της κυρίαρχης παρουσίας του *S. aureus*, ως υπεύθυνου μικροοργανισμού στις αρθρικές λοιμώξεις, οφείλεται κυρίως σε μια σειρά λοιμογόνων παραγόντων του. (P. Colavite, 2014) Επιπλέον, οι στρεπτόκοκκοι των ομάδων A, B, C και G, έχουν απομονωθεί σε αρκετές περιπτώσεις σηπτικής αρθρίτιδας, η οποία έχει εκδηλωθεί σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς ή σε ασθενείς με ισχυρή λοίμωξη του γαστρεντερικού ή ουρογεννητικού συστήματος. (Goldenberg DL, 1998) Τα βακτήρια *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus sp.*, *Salmonella sp.*, *Serratia marcescens*, και *Neisseria sp.*, αποτελούν αιτίες εμφάνισης σηπτικής αρθρίτιδας, επίσης. (Nade S, 2003)

A.4.3. Οι κυριότεροι λοιμογόνοι παράγοντες του *Staphylococcus aureus* που σχετίζονται με την εκδήλωση σηπτικής αρθρίτιδας

A.4.3.1. Οι πρωτεΐνες ClfA (Clumping factor A) και ClfB (Clumping factor B)

Οι πρωτεΐνες ClfA και ClfB, αποτελούν μία κατηγορία πρωτεϊνών, οι οποίες ονομάζονται αντεσίνες (adhesines) και επιτρέπουν στο *S. aureus* να αποικίζει τις αρθρώσεις. Η ClfA εκφράζεται στην επιφάνεια της μεμβράνης του βακτηρίου και προσκολλάται στο ινωδογόνο και τη φιβρίνη. (McDevitt D, 1994) Η ClfB είναι άλλη μία μεμβρανική πρωτεΐνη του βακτηρίου και μεσολαβεί στην προσέγγιση του *S. aureus* στον αρθρικό χόνδρο. (Gillaspy AF, 1997)

A.4.3.2. Οι πρωτεΐνες FnBPA (Fibronectin-binding protein A) και FnBPB (Fibronectin-binding protein B)

Οι πρωτεΐνες FnBPA και FnBPB, εκφράζονται από το *S. aureus* και αναγνωρίζουν τη φιβρονεκτίνη, το φιβρινογόνο και την ελαστίνη. (Jonsson K, 1991; Wann ER, 2000; Roche FM, 2004) Οι πρωτεΐνες αυτές, επιτρέπουν τη βακτηριακή προσκόλληση και την περαιτέρω εισβολή του σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, όπως τα επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα, οι ινοβλάστες και οι οστεοβλάστες. (Sinha B, 1999; McElroy MC, 2002) Έχει προταθεί ότι, η προαναφερθείσα εισβολή του βακτηρίου, ενδέχεται να αποτελεί ένα μηχανισμό, μέσω του οποίου, τα βακτήρια του γένους *Staphylococci* αποφεύγουν την άμυνα του ξενιστή, και ως εκ τούτου, δε θανατώνονται από την εφαρμογή αντιβιοτικής θεραπείας. (P. Colavite, 2014)

A.4.3.3. Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμένα

Πρόσφατα, η ικανότητα των βακτηρίων *S. aureus* να σχηματίζουν βιοϋμένα, έχει θεωρηθεί ως ένας από τους κυριότερους λοιμογόνους παράγοντες του συγκεκριμένου παθογόνου μικροοργανισμού. (Foster TJ, 2013) Οι βιοϋμένες είναι

μορφώματα που σχηματίζονται από τη συνάθροιση βακτηριακών κυττάρων πάνω σε μία επιφάνεια, και τα οποία συγκρατούνται μεταξύ τους μέσω μίας θεμέλιας ουσίας εξωκυτταρικών συστατικών, που προέρχονται τόσο από τα βακτήρια, όσο και από τον ξενιστή. (P. Colavite, 2014) Αξίζει να σημειωθεί ότι, οι προσθετικές αρθρώσεις έχουν περιγραφεί ως η πιο χαρακτηριστική περίπτωση υποστρώματος, το οποίο υποστηρίζει τη δημιουργία αυτών των βακτηριακών αποικιών (Otto M, 2013), αλλά τον ίδιο ρόλο επωμίζονται και διάφορες δομές των αρθρώσεων. (Brooks JL, 2012) Ωστόσο, η πιθανότητα συσχέτισης μεταξύ της ικανότητας του *S. aureus* να προκαλεί την καταστροφή των αρθρώσεων και της δυνατότητάς του να σχηματίζει βιοϋμένια, είναι μία υπόθεση που δεν έχει εδραιωθεί, και επομένως, χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. (P. Colavite, 2014)

A.4.3.4. Η ικανότητα αποφυγής της ανοσιακής άμυνας του ξενιστή

Η αυξημένη μολυσματικότητα του *S. aureus*, συγκριτικά με άλλους λοιμώδεις παράγοντες, έχει αποδοθεί, σε ένα βαθμό, στην πληθώρα στρατηγικών που έχει αναπτύξει ώστε να διαφεύγει των αμυντικών μηχανισμών του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή. (Kim JH, 2011) Κάποιοι από αυτούς τους μηχανισμούς, όπως η έκφραση μίας εξωκυτταρικής κάψουλας, αποτελούμενης από πολυσακχαρίτες, η απελευθέρωση φορμυλιωμένων πεπτιδίων, τα οποία προωθούν την προσέλκυση ουδετερόφιλων στην περιοχή του αρθρικού υμένα, καθώς και η παραγωγή μορίων με ιδιότητες υπερ-αντιγόνου, που διαθέτουν την ξεχωριστή ιδιότητα να ενεργοποιούν ένα μεγάλο αριθμό T λεμφοκυττάρων και την επακόλουθη παραγωγή κυτοκινών από αυτά, έχουν συνδεθεί με υψηλότερους ρυθμούς αρθρικής αλλοίωσης. (P. Colavite, 2014)

A.4.3.5. Πρόγνωση

Τα ποσοστά θνησιμότητας της σηπτικής αρθρίτιδας ποικίλλουν, σε διάφορες έρευνες που έχουν διεξαχθεί, αλλά στην περίπτωση της μονοαρθρικής αρθρίτιδας φαίνεται να είναι περίπου στο 11%. (Coakley G, 2006) Ο κίνδυνος για προσωρινή έλλειψη της λειτουργίας της άρθρωσης προσεγγίζει ένα ποσοστό της τάξης του 40%. (Kaandorp CJ, 1995) Η καθυστερημένη διάγνωση, η προχωρημένη ηλικία, οι λανθάνουσες ασθένειες των αρθρώσεων και η παρουσία συνθετικών υλικών στο εσωτερικό τους, αποτελούν καταστάσεις που συντελούν στη μη επιτυχή πρόγνωση. (Miriam García-Arias, 2011)

A.4.3.6. Λοιμώξεις περιπροθετικών αρθρώσεων: Μία ιδιαίτερη περίπτωση

Οι περιπροθετικές αρθρώσεις αποτελούν μια ιδιαίτερη περίπτωση πρόκλησης αρθρικών λοιμώξεων, δεδομένου ότι, παρέχουν ένα φυσιολογικό χώρο εγκατάστασης των μικροοργανισμών, και ως εκ τούτου, ενδέχεται να αποτελέσουν μία δυνητική περιοχή μόλυνσης. (Miriam Garcia-Arias, 2011) Οι λοιμώξεις που προκύπτουν ύστερα από μία τυπική διαδικασία αντικατάστασης άρθρωσης, μπορούν να οδηγήσουν σε καταστροφικές επιπλοκές. (Steckelberg JM, 2000) Σε ασθενείς με πρωτοπαθή αντικατάσταση άρθρωσης, η πιθανότητα μόλυνσης στα πρώτα δύο χρόνια μετά την επέμβαση, είναι μικρότερη από 1% στο ισχίο και στις αρθρώσεις των ώμων, μικρότερη από 2% στα γόνατα και μικρότερη από 9% στους αγκώνες. (Zimmerli W, 2004) Τα μοσχεύματα των προσθετικών αρθρώσεων συχνά καλύπτονται με πρωτεΐνες του ξενιστή, συνήθως φιμπρονεκτίνη και ινωδογόνο, σε μικρό χρονικό διάστημα μετά τη μόλυνση. (Miriam Garcia-Arias, 2011) Το γεγονός αυτό, επιτρέπει στις προσθετικές αρθρώσεις να δράσουν ως μία επιφάνεια προς αποικισμό για τα βακτήρια, τα οποία προσκολλώνται σε αυτή, μέσω των υποδοχέων φιμπρονεκτίνης και ινωδογόνου που διαθέτουν στην επιφάνεια της μεμβράνης τους. (Francois P, 1998) Μετά τον αποικισμό της περιοχής της προσθετικής άρθρωσης, τα βακτήρια σχηματίζουν ένα λεπτό στρώμα που καλείται βιοϋμένας και το οποίο λειτουργεί ως βασικός μηχανισμός επιβίωσης, επιτρέποντάς τους να αντιστέκονται σε εξωτερικούς και εσωτερικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες. (Costerton JW, 1999) Επίσης, τα μοσχεύματα, μερικές φορές επιδρούν μειώνοντας την αιματική ροή και κατ' αυτόν τον τρόπο θέτουν σε κίνδυνο την τοπική ανοσία, διαταράσσοντας τη λειτουργία των φυσικών φονικών κυττάρων, των λεμφοκυττάρων και των φαγοκυττάρων. Η κατάσταση αυτή επιφέρει την απελευθέρωση δραστικών ριζών οξυγόνου και λυσοσωμικών ενζύμων, τα οποία μπορεί να οδηγήσουν σε καταστροφή των ιστών του ξενιστή και τοπική αγγειακή ανεπάρκεια. (Miriam Garcia-Arias, 2011) Ως εκ τούτου, τα μοσχεύματα δεν αποτελούν μόνο ένα υπόστρωμα, πάνω στο οποίο μπορούν να προσκολληθούν τα βακτήρια, αλλά επιπλέον, περιορίζουν την ικανότητα του ξενιστή να ανταποκριθεί στη λοίμωξη. (Roisman FR, 1983)

A.4.3.6.1. Παράγοντες κινδύνου

Οι παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο μόλυνσης των προσθετικών αρθρώσεων, περιλαμβάνουν μία ποικιλία καταστάσεων, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η ψωρίαση, η ανοσοκαταστολή, το κακό διατροφικό προφίλ, η παχυσαρκία, ο σακχαρώδης διαβήτης, η προχωρημένη ηλικία, η κακοήθεια, η επαναλαμβανόμενη λοίμωξη και οι μεταχειρουργικές λοιμώξεις. (Zimmerli W, 2004) Η βακτηριαιμία

αποτελεί έναν ακόμη προδιαθεσικό παράγοντα, ο οποίος ευθύνεται για αιματογενούς προέλευσης, λοίμωξη των προσθετικών αρθρώσεων. (Miriam Garcia-Arias, 2011)

A.4.3.6.2. Κλινικά συμπτώματα

Οι λοιμώξεις των προσθετικών αρθρώσεων παρουσιάζουν πολυάριθμα κλινικά συμπτώματα. Σε πρώιμες λοιμώξεις (εμφανίζονται σε λιγότερο από τρεις μήνες μετά τη χειρουργική επέμβαση), οι ασθενείς ενδέχεται να εκδηλώσουν πυρετό και συστηματικά συμπτώματα, καθώς και τοπικές ενδείξεις μετεγχειρητικής λοίμωξης. Οι πρώιμες λοιμώξεις προκαλούνται κυρίως από μικροοργανισμούς υψηλής μολυσματικότητας, όπως το βακτήριο *S. aureus* και οι κατά gram αρνητικοί βάκιλοι. (Miriam Garcia-Arias, 2011) Οι καθυστερημένες λοιμώξεις (συμβαίνουν σε χρονικό διάστημα τριών έως εικοσιτεσσάρων μηνών από το χειρουργείο) συνήθως προκαλούνται από λιγότερο μολυσματικούς μικροοργανισμούς, όπως τα βακτήρια του γένους *Staphylococci*. (Miriam Garcia-Arias, 2011) Τα κλινικά συμπτώματα συνήθως είναι μη ειδικά (όπως επίμονος πόνος μέτριας έντασης) και το γεγονός αυτό, μπορεί να εξηγήσει γιατί οι λοιμώξεις των προσθετικών αρθρώσεων μερικές φορές είναι δύσκολο να διαγνωσθούν. (Miriam Garcia-Arias, 2011) Τέλος, οι όψιμες λοιμώξεις (συμβαίνουν μετά από ένα χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των δύο ετών από το πέρας της χειρουργικής επέμβασης), τις περισσότερες φορές οφείλονται σε αιματογενή διασπορά, όπου η κύρια πηγή βακτηριαιμίας προέρχεται από παθολογική προσβολή του δέρματος, του αναπνευστικού, καθώς και του ουροποιητικού συστήματος. (Miriam Garcia-Arias, 2011) Ο κυριότερος παθολογικός παράγοντας είναι το στέλεχος *S. aureus* και ακολουθούν τα είδη *Streptococcus*, οι κατά gram αρνητικοί βάκιλοι και τα αναερόβια βακτήρια. (Miriam Garcia-Arias, 2011) Οι ασθενείς, τις περισσότερες φορές παραπονιούνται για την εμφάνιση ξαφνικού πόνου στην περιοχή της άρθρωσης, αλλά και για συμπτώματα γενικού τύπου. (Miriam Garcia-Arias, 2011)

A.4.3.6.3. Διάγνωση

Οι λοιμώξεις των περιπροθετικών αρθρώσεων αποτελούν μία από τις πιο δύσκολες και συχνότερες επιπλοκές των περιστατικών αρθροπλαστικής των κάτω άκρων (ισχίο και γόνατο). Ωστόσο, ακόμη, δεν υπάρχει κάποιο μεμονωμένο σύνολο διαγνωστικών κριτηρίων γι' αυτού του είδους τις λοιμώξεις. Έχουν προταθεί διάφορα, αλλά κανένα δεν έχει υιοθετηθεί ευρέως. Περαιτέρω, κάποια από τα σύνολα κριτηρίων που έχουν προταθεί αντιτίθενται μεταξύ τους. (Parvizi J, 2011) Ως εκ τούτου, συστήθηκε μία ομάδα εργασίας από τον Οργανισμό Λοιμώξεων του Μυοσκελετικού Συστήματος, η οποία ανέλυσε όλα τα διαθέσιμα στοιχεία προκειμένου να προτείνει μία

νέα ομάδα διαγνωστικών κριτηρίων για τις περιπροθετικές λοιμώξεις, με απώτερο σκοπό αυτή να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί ευρέως από όλους τους γιατρούς, τις εποπτικές αρχές (συμπεριλαμβανομένου του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων, των ιατρικών και χειρουργικών περιοδικών και της Ιατροδικαστικής Κοινότητας), καθώς και όλων των εμπλεκομένων στη διαχείριση των περιπροθετικών λοιμώξεων. Η ομάδα εργασίας αναγνώρισε ότι, σε συγκεκριμένες, χαμηλής έντασης λοιμώξεις, αρκετά από τα διαγνωστικά κριτήρια που συμπεριέλαβε στην ομάδα κριτηρίων, ενδέχεται να μην απαντώνται σε επίπεδο ρουτίνας, παρά την παρουσία περιπροθετικής λοίμωξης. Τα προτεινόμενα διαγνωστικά κριτήρια είναι τα εξής:

- ❖ Ύπαρξη κοιλότητας που βρίσκεται σε επικοινωνία με την προσθετική άρθρωση
- ❖ Η ταυτοποίηση παθογόνου μικροοργανισμού, ύστερα από την καλλιέργεια τουλάχιστον δύο ξεχωριστών δειγμάτων ιστού ή υγρού, τα οποία απομονώθηκαν από την προσβεβλημένη περιοχή της προσθετικής άρθρωσης.
- ❖ Η παρουσία τεσσάρων από τα επόμενα έξι κριτήρια (περιπροθετική λοίμωξη ενδέχεται να υπάρχει ακόμη και αν είναι παρόντα λιγότερα από τέσσερα από αυτά):
 - Αυξημένος ρυθμός καθίζησης των ερυθροκυττάρων του ορού και αυξημένη συγκέντρωση της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (C-reactive protein, CRP) του ορού.
 - Αυξημένος αριθμός λευκοκυττάρων της άρθρωσης
 - Αυξημένο ποσοστό ουδετερόφιλων της άρθρωσης
 - Παρουσία πυώδους υγρού στην προσβεβλημένη άρθρωση
 - Απομόνωση παθογόνου μικροοργανισμού σε μία καλλιέργεια περιπροθετικού ιστού ή υγρού

Με τη χρήση του παραπάνω συνόλου διαγνωστικών κριτηρίων, οι κλινικοί γιατροί μπορούν να είναι σίγουροι για τη διάγνωση της λοίμωξης και κατ' επέκταση να χορηγήσουν την κατάλληλη θεραπεία. (Javad Parvizi, 2011)

A.4.4. Η φλεγμονώδης απόκριση στην περίπτωση της σηπτικής αρθρίτιδας

Όπως προαναφέρθηκε, το *S. aureus* αποτελεί την κυρίαρχη αιτία εκδήλωσης λοιμωδών αρθρίτιδων. Ως εκ τούτου, τα ανοσοπαθογενετικά χαρακτηριστικά που περιγράφονται παρακάτω, σχετίζονται αποκλειστικά με το συγκεκριμένο παθογόνο μικροοργανισμό. Η έρευνα της σηπτικής αρθρίτιδας στους ανθρώπους, περιορίζεται, όχι μόνο από τη δυσκολία προσδιορισμού της ακριβούς χρονικής στιγμής έναρξης της λοίμωξης, αλλά και από τη δυσκολία απομόνωσης δειγμάτων ιστού, από τα διάφορα

τμήματα του ιστού της άρθρωσης, όπως η μεμβράνη του αρθρικού υμένα, ο χόνδρος και το υποχόνδριο οστό. Επομένως, οι περισσότερες από τις πληροφορίες που παρατίθενται παρακάτω, προέρχονται από πειραματικές μελέτες σε μοντέλα ποντικών προσβεβλημένων από το *S. aureus*. (P. Colavite, 2014)

A.4.4.1. Η δράση των κυτοκινών των μακροφάγων

Μετά τον αποικισμό του αρθρικού υγρού, τα βακτήρια *S. aureus* πολλαπλασιάζονται με ταχύ ρυθμό, προκαλώντας οξεία φλεγμονώδη απόκριση. Υπό αυτές τις συνθήκες, τα μακροφάγα του ξενιστή παράγουν φλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως η ιντερλευκίνη-1β (Interleukine 1-b,) η ιντερλευκίνη-6 (Interleukine-6) (Miriam García-Arias, 2011) και ο TNFα (Tumor necrosis factor alpha), γεγονός που συνοδεύεται από τη ραγδαία κινητοποίηση στην περιοχή της άρθρωσης, πολυπομορφοπύρηνων κοκκιοκυττάρων, ενεργοποιημένων μακροφάγων και τελικά T λεμφοκυττάρων. (Bremell T, 1992) Κατ' αυτόν τον τρόπο, και υπό την προϋπόθεση ότι ο ξενιστής δεν είναι ανοσοκατεσταλμένος, δημιουργείται μία προστατευτική φλεγμονώδη απόκριση, κατά την οποία τα παθογόνα βακτήρια περιορίζονται, ως αποτέλεσμα της δράσης των κυττάρων που έχουν στρατολογηθεί, η οποία οδηγεί στον τερματισμό της λοίμωξης. (Miriam García-Arias, 2011)

A.4.4.2. Ο ρόλος των κυτοκινών των T λεμφοκυττάρων

Εν αντιθέσει με τα B κύτταρα, τα οποία δε φαίνεται να συνεισφέρουν στην επαγωγή της φλεγμονώδους απόκρισης από τη λοίμωξη με το *S. aureus*, τα T λεμφοκύτταρα και οι κυτοκίνες που παράγουν εμπλέκονται ξεκάθαρα σ' αυτή την ασθένεια. (Gjertsson I, 2000) Η IL-17 αποτελεί την πιο πρόσφατα ανακαλυφθείσα κυτοκίνη, η οποία παράγεται από υπότυπους T λεμφοκυττάρων. (Kim JS, 2013) Πλέον, έχει εδραιωθεί η υπόθεση ότι, αυτή η κυτοκίνη είναι ένας σημαντικός μεσολαβητής της ρευματοειδούς αρθρίτιδας στα ποντίκια και στους ανθρώπους (Nakae S, 2003), αλλά ο ρόλος της στην επαγόμενη από το *S. aureus* σηπτική αρθρίτιδα, σε ένα μεγάλο βαθμό, παραμένει άγνωστος. (P. Colavite, 2014) Δημοσιευμένα δεδομένα από την επιστημονική ομάδα του Henningsson και των συνεργατών του (Henningsson L, 2010), προτείνουν ότι, η IL-17 σχετίζεται περισσότερο με την τοπική ανοσιακή άμυνα του ξενιστή, ενάντια στην αρθρίτιδα που επάγεται από το *S. aureus*, και λιγότερο με τη συστηματική άμυνα. Η ερευνητική ομάδα της Colavite PM και των συνεργατών της, πρόσφατα δημοσίευσε ότι, η μεταβλητότητα των αρθρικών αλλοιώσεων από λοιμώξεις με διάφορα στελέχη *S. aureus*, τα οποία απομονώθηκαν από βιολογικά δείγματα, πιθανόν να σχετίζεται με την ικανότητα του

κάθε στελέχους να ενεργοποιεί με διαφορετικό τρόπο την παραγωγή της IL-17. (Colavite-Machado PM, 2013)

A.4.4.3. Η σχέση μεταξύ των κυτοκινών, TNFα, IL-1b και IL-6 και της αρθρικής καταστροφής

Στην περίπτωση που η λοίμωξη δεν τερματιστεί σε εύθετο χρόνο, τα υψηλά επίπεδα κυτοκινών που παράγονται από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα του ανοσοποιητικού συστήματος, μπορούν να οδηγήσουν σε καταστροφή των αρθρώσεων. (Miriam García-Arias, 2011) Αυτό συμβαίνει, διότι, οι TNFα, IL-1b και IL-6 ενεργοποιούν τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών και τη συνεπαγόμενη οστική απορρόφηση. (Kwan S, 2004) Ο TNFα θεωρείται ως η κυτοκίνη με την πιο ισχυρή δράση στην ενεργοποίηση των οστεοκλαστών, και επιπροσθέτως, ενεργοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα NF-kB, ο οποίος, με τη σειρά του, συνδέεται με την επιβίωση των κυττάρων αυτών. (Verdrengh M, 2006)

A.4.4.4. Η σύνδεση μεταξύ των κυτοκινών, των μεταλλοπρωτεασών και της αρθρικής καταστροφής

Στις περιπτώσεις όπου δεν επέρχεται ο τερματισμός της λοίμωξης, οι υψηλές συγκεντρώσεις κυτοκινών επάγουν την απελευθέρωση μεταλλοπρωτεασών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Matrix metalloproteinases, MMPs), από ενεργοποιημένα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, οι οποίες έχουν την ικανότητα αποικοδόμησης του κολλαγόνου και άλλων πρωτεϊνών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και κατ' επέκταση την απώλεια του χόνδρου. (Gjertsson I, 2005; Shirtliff M.E., 2002; Wright J.A., 2010) Αυτά τα ένζυμα επιτελούν πολλές φυσιολογικές λειτουργίες, αλλά η αρνητική επίπτωση της δράσης τους είναι εξαιρετικά πιθανή, όταν τα επίπεδά τους είναι ιδιαίτερα αυξημένα, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των φλεγμονωδών αποκρίσεων. Η δράση των μεταλλοπρωτεασών, MMP-2 και MMP-9, είναι σημαντική για την παθογένεση των ασθενειών που σχετίζονται με καταστροφή των αρθρώσεων, διότι εμφανίζουν τη δυνατότητα αποικοδόμησης μεγάλης ποικιλίας τύπων κολλαγόνου. (Murphy G., 2008)

A.4.4.5. Ο ρόλος των κυττάρων FLS (Fibroblast-like synoviocytes) στη φλεγμονώδη απόκριση και στην καταστροφή της άρθρωσης

Ενώ οι MMPs μπορούν να παραχθούν από ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα που έχουν στρατολογηθεί στην περιοχή του φλεγμαίνοντος αρθρικού υμένα, υποστηρίζεται όλο και περισσότερο το γεγονός ότι, τα κύτταρα FLS αποτελούν μία βασική πηγή αυτών των πρωτεασών σε περιστατικά φλεγμονώδους αρθρίτιδας.

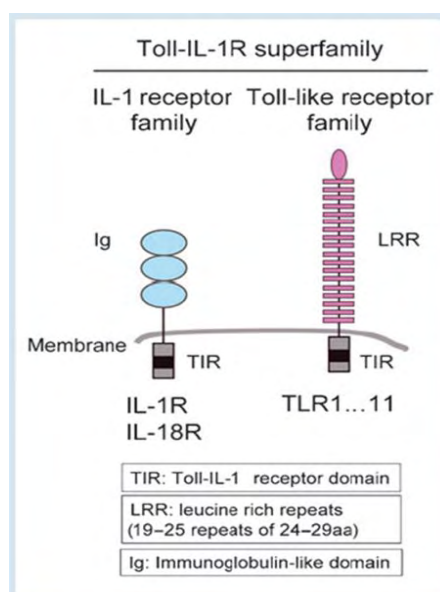
(Bartok B, 2010; Mor A, 2005; Noss E.H., 2008) Τα FLS κύτταρα ανταποκρίνονται στη φλεγμονώδη απόκριση παράγοντας φλεγμονώδεις μεσολαβητές, συμπεριλαμβανομένων των ιντερλευκινών, IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IL-21, του TNFα, του TGF (Transforming growth factor) και της IFN-γ (Gamma interferon). (Romina S, 2011) Συγκεκριμένα, έχειδειχτεί ότι, οι κυτοκίνες TNF και IL-1 αποτελούν τους κυριότερους ενεργοποιητές της παραγωγής MMPs από τα κύτταρα FLS. (Mor A, 2005) Θεωρείται ότι, αυτές οι κυτοκίνες παράγονται κυρίως από ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα, τα οποία έχουν προσελκυθεί στη φλεγμαίνουσα περιοχή του αρθρικού υμένα. Αυτού του είδους η προσέλκυση μπορεί να μεσολαβηθεί από χημοκίνες που παράγονται από τα FLS, ως απόκριση των τελευταίων στη λοίμωξη, εγκαθιδρύοντας έτσι ένα δίκτυο κυτοκινών μεταξύ των FLS κυττάρων και των μακροφάγων. (Romina S, 2011) Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι, η παραγωγή MMPs από τα FLS μπορεί να αυξηθεί όχι μόνο εξαιτίας των κυτοκινών, αλλά και ως απόκριση στον εντοπισμό βακτηριακών αντιγόνων. (Romina S, 2011) Αυτό συμβαίνει, διότι, τα κύτταρα αυτά εκφράζουν στην επιφάνειά τους υποδοχείς Toll-like και ιδιαίτερα τον TLR2. (Seibl R, 2003) Αποτελέσματα ερευνών σε ανθρώπινα FLS, τα οποία είχαν εκτεθεί σε προϊόντα κυτταρικής λύσης ή φιλτραρισμένα υπερκείμενα καλλιιεργειών του *S. aureus*, έδειξαν αυξημένη έκφραση διάφορων MMPs, συγκριτικά με FLS κύτταρα που δεν είχαν εκτεθεί στο συγκεκριμένο παθογόνο μικροοργανισμό. (Kanangat S, 2006) Τέλος, σε μία άλλη μελέτη, παρατηρήθηκε αύξηση των mRNA των MMPs σε ανθρώπινα FLS, τα οποία είχαν εκτεθεί σε πεπτιδογλυκάνη σταφυλόκοκκου, καθώς και των επιπέδων των IL-6 και IL-8. (Kyburz D, 2003)

A.5. Οι υποδοχείς Toll-like (Toll-like receptors, TLRs) και η σημασία τους στη φλεγμονώδη απόκριση

A.5.1. Γενικές πληροφορίες για τους TLRs

Οι TLRs είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου I. Έχουν ταξινομηθεί δέκα TLRs στον άνθρωπο (TLR1-TLR10) και δώδεκα στον ποντικό (TLR1-9, TLR11-13). (Gay NJ, 2007) Αποτελούν τμήμα της υπεροικογένειας υποδοχέων TIR (Toll/interleukin-1 Receptors), η οποία συμπεριλαμβάνει τους IL-1Rs (Interleukin-1 Receptors), εξαιτίας της ομολογίας που παρουσιάζουν οι κυτταροπλασματικές τους επικράτειες. Ωστόσο, η εξωκυτταρική επικράτεια των IL-1Rs αποτελείται από μία επικράτεια ανοσοσφαιρίνης G, ενώ η αντίστοιχη δομή των TLRs περιέχει επαναλαμβανόμενα και ποικίλης σύστασης, μοτίβα αμινοξικών αλληλουχιών πλούσιων σε λευκίνη, γνωστά ως Leucine-Rich Repeats (LRRs). Η ξεχωριστή διάταξη των LRRs σε κάθε κατηγορία TLR, παρέχει ένα μοναδικό πρότυπο αναγνώρισης

μικροβιακών παραγόντων, εξειδικεύοντας μ' αυτόν τον τρόπο την αλληλεπίδρασή τους (Εικόνα 2). (Bowie A, 2000)

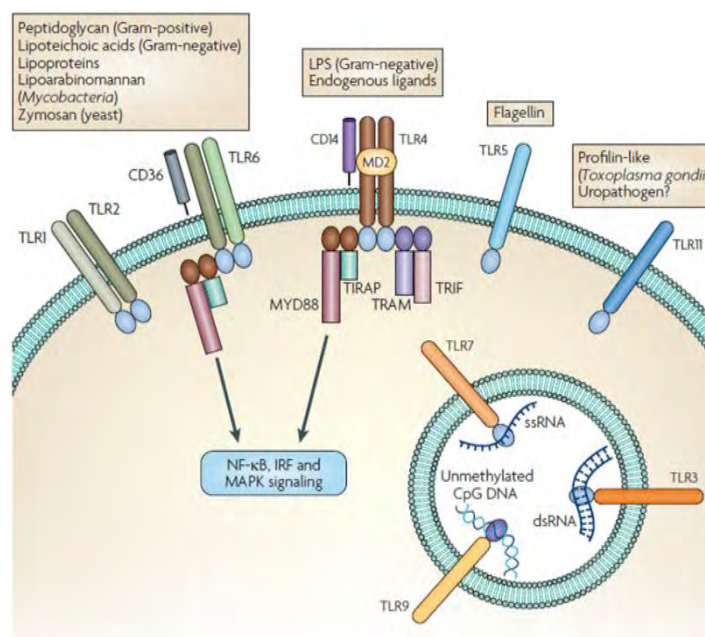


Εικόνα 2. Οι υποδοχείς της ιντερλευκίνης-1 (IL-1 receptor, IL-1R) και οι υποδοχείς Toll-like (Toll-like Receptors, TLRs)

A.5.2. Η κατηγοριοποίηση των TLRs με βάση το είδος των μικροβιακών παραγόντων που προσδένονται στην εξωκυτταρική τους επικράτεια

Τα κυριότερα μικροβιακά συστατικά με ικανότητα πρόσδεσης στους TLRs είναι τα εξής: α) Λιποπολυσακχαρίτες (LPS) κατά gram αρνητικών βακτηρίων, οι οποίοι ενεργοποιούν τους TLR4 β) Βακτηριακές λιποπρωτεΐνες και λιποτειχοϊκό οξύ που πυροδοτούν τους TLR1, TLR2 και TLR6 γ) Βακτηριακές φλαγγελίνες που ενεργοποιούν τους TLR5 δ) Συστατικά του πρωτοζώου *Toxoplasma gondii* που μοιάζουν με την προφιλίνη και προσδένονται στους TLR11 ε) Μη μεθυλιωμένα μοτίβα CpG στο DNA που δρουν ως επαγωγείς των TLR9 στ) Δίκλωνο RNA που πυροδοτεί τους TLR3 ζ) Μονόκλωνο RNA που ενεργοποιεί τους TLR7 και TLR8. (Takeda K, 2005) Εκτός από τα μικροβιακά συστατικά, έχει δημοσιευτεί και ένας συνεχώς αυξανόμενος αριθμός ενδογενών συστατικών, που θεωρούνται δυνητικοί ενεργοποιητές των TLRs και συγκεκριμένα, των TLR2 και TLR4. Στα συστατικά αυτά, περιλαμβάνονται οι πρωτεΐνες του θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins, HSPs) HSP60, HSP70 και HSPB8, η ενδοπλασμίνη, η Α-αλυσίδα της α-κρυσταλλίνης (7. Ohashi K, 2000; Vabulas R. M., 2001; Vabulas R. M., 2002; Asea A., 2002; Dybdahl B, 2002; Vabulas R. M., 2002; Roelofs M. F., 2006) και διάφορα προϊόντα της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, όπως η φιμπρονεκτίνη και το ινωδογόνο. (Okamura Y., 2001; Smiley S. T., 2001)

Ανάλογα με την προέλευση των παραγόντων που προσδένονται στην επικράτειά τους, οι TLRs εντοπίζονται σε διακριτά κυτταρικά διαμερίσματα. Συνεπώς, αυτοί που αναγνωρίζουν βακτηριακά προϊόντα εκφράζονται στην πλασματική μεμβράνη (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 και TLR6), ενώ εκείνοι που εντοπίζονται να αλληλεπιδρούν με ιικά και βακτηριακά νουκλεϊκά οξέα εντοπίζονται σε ενδολυσοσωμικά διαμερίσματα (TLR3, TLR7 και TLR9) (Εικόνα 3). (Takeda K, 2005)



Εικόνα 3. Οι TLRs εκφράζονται σε διακριτά κυτταρικά διαμερίσματα

A.5.3. Ο μηχανισμός λειτουργίας των υποδοχέων Toll-like

Κατά τη διάρκεια βακτηριακής, ιικής και μυκητιακής μόλυνσης, οι TLRs προσδένονται με τα PAMPs, με αξιοσημείωτη αποτελεσματικότητα, (Kumar H, 2011; Medzhitov R, 1997; Hedayat M, 2011) και η αλληλεπίδραση αυτή, επιφέρει την ενεργοποίηση σηματοδοτικών καταρρακτών που επάγουν την έκφραση κυτοκινών, χημοκινών και άλλων συνδιεγερτικών μορίων. Συγκεκριμένα, η πρόσδεση ενός παθογόνου συστατικού, έχει ως αποτέλεσμα το διμερισμό των αλυσίδων δύο TLRs, καθώς και διάφορες μορφολογικές αλλαγές που επιτρέπουν τη στρατολόγηση πρωτεϊνικών μορίων-προσαρμογέων, τα οποία έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με την κυταροπλασματική περιοχή TIR των υποδοχέων Toll-like. Στα μόρια-προσαρμογείς ανήκουν οι πρωτεΐνες MyD88 (myeloid differentiation factor 88), TICAM1 (TIR-domain-containing molecule 1) ή TRIF, TIRAP (TIR-associated protein) ή MAL (MyD88-adaptor-like) και TICAM2 (TIR-domain-containing molecule 2) ή

TRAM (TRIF-related adaptor molecule). Η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών αυτών με την περιοχή TIR του TLR, επάγει την έναρξη σηματοδοτικών καταρρακτών, όπως αυτών του NF- κ B (Nuclear factor kappa B) και MAPK (Mitogen-activated protein kinase), με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών, χημοκινών, ιντερφερονών τύπου I (Interferons type I, IFNs-I) και άλλων παραγόντων της φλεγμονής. (Fitzgerald KA, 2001; Akira S, 2003)

A.5.4. Οι κατηγορίες σηματοδοτικών καταρρακτών που επάγει η ενεργοποίηση των TLRs

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται μετά την αλληλεπίδραση του TLR με τον παθογόνο παράγοντα, ομαδοποιούνται σε δύο κύριες κατηγορίες: σε αυτά που εξαρτώνται από την πρωτεΐνη-προσαρμογέα MyD88 και σε αυτά που δεν εξαρτώνται από αυτή (γνωστά και ως TRIF-εξαρτώμενα μονοπάτια). (Brikos C, 2008)

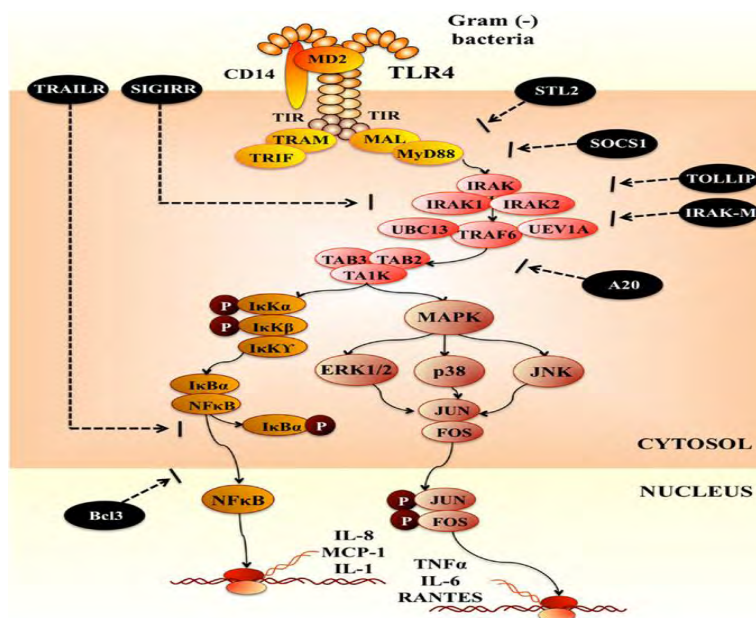
A.5.4.1. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εξαρτώνται από την πρωτεΐνη-προσαρμογέα MyD88

A.5.4.1.1. Το NF- κ B σηματοδοτικό μονοπάτι επάγει την έκφραση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και χημοκινών

Η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων NF- κ B αποτελείται από πέντε μέλη: p50, p52, p65 (RelA), c-Rel, και RelB. Στα περισσότερα κύτταρα, ο NF- κ B εντοπίζεται στο κυτόπλασμα, σε λανθάνουσα κατάσταση, συνδεδεμένος με τις ανασταλτικές πρωτεΐνες I κ B (I kappa B), οι οποίες, κατ' αυτόν τον τρόπο παρεμποδίζουν τη σηματοδοτική ενεργοποίηση που προκύπτει, από τη συνάθροιση του μεταγραφικού παράγοντα NF- κ B στον πυρήνα του κυττάρου. Η ενεργοποίηση του NF- κ B σηματοδοτικού καταρράκτη, έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση του NF- κ B από το κυτόπλασμα στον πυρήνα και την επακόλουθη έκφραση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και χημοκινών, καθώς και αντιμικροβιακών μορίων. (Rui Zhou, 2012)

Αναλυτικότερα, όλοι οι TLRs, με εξαίρεση τον TLR3, δρουν σε συνδυασμό με την πρωτεΐνη-προσαρμογέα MyD88, η οποία, έπειτα, κινητοποιεί μέλη της οικογένειας κινασών IRAK (IL-1R-associated kinase). Στη συνέχεια, οι κινάσες IRAK αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη TRAF6 {Tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 6}, η οποία παρουσιάζει δράση E3 λιγάσης ουβικουιτίνης, αυτό-πολυουβικιτινιώνεται και ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες TAB (TAK1-binding proteins). (Bartel DP, 2004; Fabian MR, 2010; R.C. Friedman, 2009) Η αλληλεπίδραση των TAB2, TAB3 με την ουβικουιτίνη επάγει την ενεργοποίηση της TAK1 (Transforming growth factor beta-activated kinase 1). Αυτού του είδους η ενεργοποίηση απαιτείται, τόσο για τη φωσφορυλίωση της κινάσης I κ Bα από το σύμπλεγμα των IKK κινασών

(IκK-α, IκK-β, IκK-γ), όσο και για την ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών MAPK. Η φωσφορυλίωση της IκBa κινάσης, έχει ως αποτέλεσμα την ουβικιτινίωση και επακόλουθα την αποικοδόμησή της, πυροδοτώντας, έτσι, τη μεταφορά του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB στον πυρήνα του κυττάρου (Εικόνα 4). (Clark K, 2013)



Εικόνα 4. Η επαγωγή της φλεγμονής μέσω της TLR4 σηματοδότησης

A.5.4.1.2. Τα MAPK σηματοδοτικά μονοπάτια οδηγούν στην παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών

Η πρωτεΐνη TAK1, ενεργοποιεί, επίσης, τα σηματοδοτικά MAPK μονοπάτια, όπως τα ERK1/2, p38 και JNK, τα οποία θεωρούνται κρίσιμης σημασίας για την παραγωγή μορίων-μεσολαβητών του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα μονοπάτια ERK1/2, p38 και JNK φωσφορυλιώνουν στόχους (συμπεριλαμβανομένων άλλων κινάσων και μεταγραφικών παραγόντων), οι οποίοι, με τη σειρά τους, ρυθμίζουν τη μεταγραφή πολλών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων αυτών που κωδικοποιούν προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες. (Εικόνα 4). Αξίζει να σημειωθεί ότι, το μονοπάτι ERK1/2, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην έμφυτη ανοσία και στη φλεγμονώδη απόκριση. (Kawai T and Akira S, 2010; Arthur JS and Ley SC, 2013; Coll RC and O' Neill LA, 2010; Symons A, 2006; Cohen P, 2014)

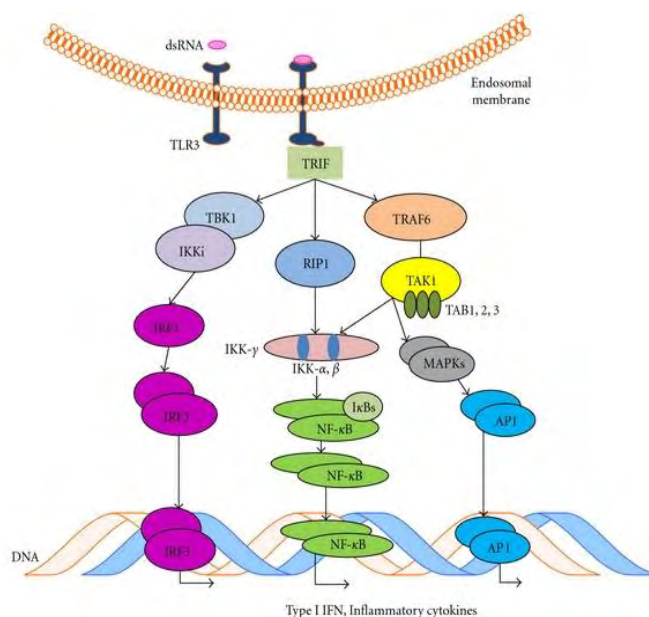
A.5.4.1.3. Οι TLR4 και TLR2 ενεργοποιούν τον NF-κB

Η σηματοδότηση μέσω του TLR4 είναι ξεχωριστή, από την άποψη ότι, ενεργοποιεί και τις δύο κατηγορίες σηματοδοτικών καταρρακτών, MyD88-εξαρτώμενων και μη. Συγκεκριμένα, ο TLR4 ωθεί τις MyD88 και MAL να

ενεργοποιήσουν τον NF-κB, και επιπλέον, είναι σε θέση να ενεργοποιήσει τους IRFs (Interferon regulatory factors, IRFs) μέσω της αλληλεπίδρασής του με τις TRIF και TRAM και την επακόλουθη παραγωγή των IFNs-I (IFN α/β). Ο TLR2, απαιτεί κι αυτός την παρουσία της MAL (επιπροσθέτως της παρουσίας της MyD88), προκειμένου να ενεργοποιηθεί το εξαρτώμενο από την MyD88 σηματοδοτικό μονοπάτι και κατά συνέπεια, η ενεργοποίηση του NF-κB και η παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών (Εικόνα 4). (Takeda K, 2005)

A.5.4.2. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εξαρτώνται από την πρωτεΐνη-προσαρμογέα TRIF

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εξαρτώνται από την πρωτεΐνη-προσαρμογέα TRIF, μεσολαβούν στην έκφραση των αντιικών, IFN-I (π.χ. IFN $\alpha/\beta/\gamma$) μέσω των IRFs (π.χ. IRF3/7). Πιο αναλυτικά, η TRIF, που αλληλεπιδρά με τους TLR3, καθώς και με τους TLR4, ενεργοποιεί ένα σηματοδοτικό μονοπάτι εξαρτώμενο από την TRAF3 (TNF receptor associated factor 3), το οποίο με τη σειρά του επάγει την ενεργοποίηση της κινάσης TBK1 {TRAF family member-associated NF-κB activator (TRAF)-binding kinase 1} και της κινάσης-αναστολέα του NF-κB, IKKi. Το σύμπλεγμα TBK1/IKKi φωσφορυλιώνει το μεταγραφικό παράγοντα IRF3, οδηγώντας στη μετατόπιση του τελευταίου στον πυρήνα και την επακόλουθη ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου της ιντερφερόνης-β (Εικόνα 5). (Kawai T and Akira S, 2010)



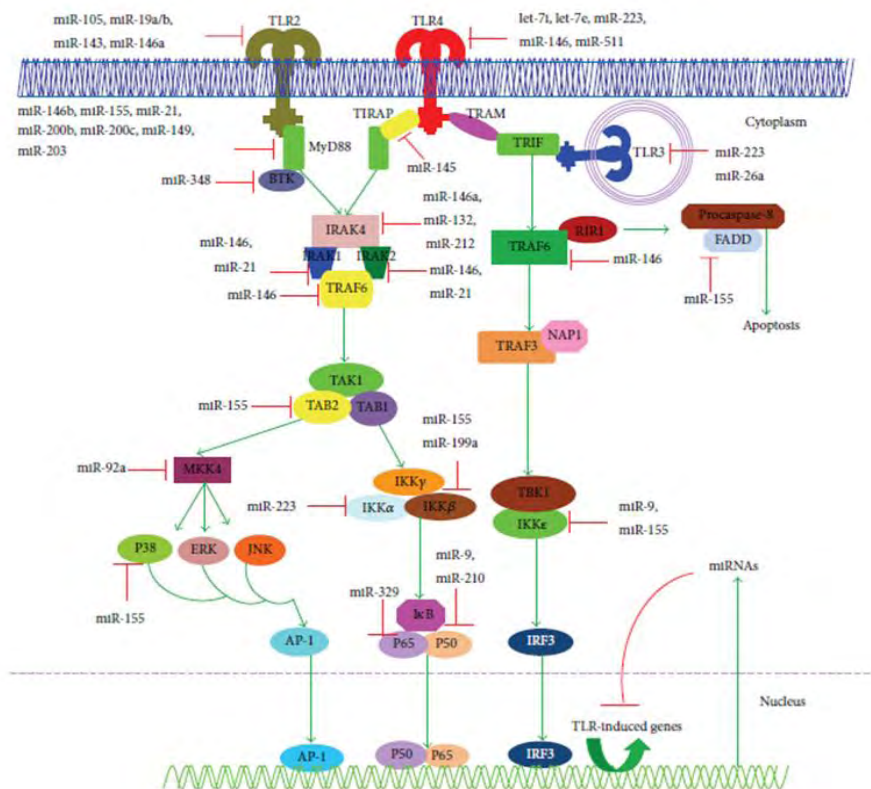
Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση της TRIF-εξαρτώμενης σηματοδότησης

A.6. Τα microRNAs ρυθμίζουν την έκβαση των σηματοδοτικών μονοπατιών που επάγονται από την ενεργοποίηση των TLRs

Τα microRNAs (miRNAs ή miRs), μία κατηγορία μικρών, μη κωδικών RNA μορίων, είναι κεντρικοί, μετα-μεταγραφικοί ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης. (Bartel DP, 2004; Ambros V, 2004) Πρόσφατες έρευνες, έχουν δείξει ότι, τα miRNAs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των σηματοδοτικών μονοπατιών που επάγονται από την ενεργοποίηση των TLRs, λειτουργώντας, έτσι, ως ρυθμιστικά μόρια του πολύπλοκου δικτύου του ανοσοποιητικού συστήματος. (Xiaobing He, 2014) Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι, η έκφραση των miRNAs στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, ως επί το πλείστον, ελέγχεται από την ενεργοποίηση των TLRs και από τα NF-κB και MAPK σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγονται ως απόρροια της ενεργοποίησης αυτής. (Zhou R, 2011; O'Neill LA, 2011)

Η παρατεταμένη, ωστόσο, ενεργοποίηση των TLR/NF-κB σηματοδοτικών καταρρακτών, μπορεί να έχει καταστροφικές συνέπειες για την υγεία του ξενιστή και να οδηγήσει σε βλάβες των ιστών και χρόνιες φλεγμονώδεις ασθένειες. (Kobayashi KS, 2004) Αντιθέτως, μία καθυστερημένη ή ελλιπώς αποτελεσματική απόκριση της TLR/NF-κB σηματοδότησης, ενδέχεται να συντελέσει στη διάδοση μίας ασθένειας. Εξαιτίας της ακριβούς ισορροπίας που απαιτείται για την προστασία του ξενιστή, τόσο από τα μικροβιακά παθογόνα, όσο και από τις βλάβες που προκαλούνται από την παρατεταμένη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει πολλαπλούς μηχανισμούς αυτορύθμισης, ούτως ώστε να επιτευχθεί η βέλτιστη ρύθμιση των ανοσιακών αποκρίσεων. (Chen XM, 2008) Τα miRNAs, έχουν την ικανότητα ρύθμισης της ανοσολογικής απόκρισης που επάγεται από τους TLRs, σε κάθε στάδιο του δικτύου της έμφυτης ανοσίας και ειδικότερα, μέσω της ρύθμισης της έκφρασης των εξής πέντε κατηγοριών πρωτεϊνών (Εικόνα 6):

- ❖ TLRs
 - ❖ Πρωτεΐνες που εμπλέκονται άμεσα στους σηματοδοτικούς καταρράκτες που επάγονται από την ενεργοποίηση των TLRs
 - ❖ Μεταγραφικοί παράγοντες που εκφράζονται από τη διεκπεραίωση των TLR-επαγόμενων σηματοδοτικών καταρρακτών
 - ❖ Λειτουργικές κυτοκίνες και χημοκίνες που παράγονται με την ολοκλήρωση των σηματοδοτικών μονοπατιών
 - ❖ Διάφορα ρυθμιστικά μόρια της TLRs σηματοδότησης
- (Xiaobing He, 2014)



Εικόνα 6. Η εύρυθμη λειτουργία των TLR-επαγόμενων σηματοδοτικών καταρρακτών πραγματοποιείται από τα miRNAs μέσω της ρύθμισης της έκφρασης πέντε κατηγοριών πρωτεϊνών

A.7. Tα microRNAs

A.7.1. Γενικές πληροφορίες

Τα miRNAs αποτελούν μία πρόσφατα ανακαλυφθείσα τάξη μη κωδικών RNA μορίων. (V. Ambros, 2001; R.C. Lee and V. Ambros, 2001; M. Lagos-Quintana, 2001; N.C. Lau, 2001.) Τυπικά, αποτελούν μονόκλωνα RNA μόρια, μήκους δεκαοχτώ έως εικοσιτεσσάρων νουκλεοτιδίων, τα οποία καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, είτε με απευθείας καταστολή της μετάφρασης του mRNA, είτε με αποσταθεροποίηση της δομής του. (D.P. Bartel, 2009) Αν και είχε θεωρηθεί ότι, δρουν, κυρίως καταστέλλοντας τη μετάφραση των mRNA-στόχων, πρόσφατα δεδομένα έδειξαν ότι, σε συστήματα θηλαστικών, η κυριότερη λειτουργία τους είναι η μείωση των επιπέδων των mRNA-στόχων. (Guo, H., 2010). Συναντώνται σχεδόν σε όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς, όπως τα φυτά, τα αρθρόποδα και τα σπονδυλωτά, υποδεικνύοντας κατ' αυτόν τον τρόπο ότι αντιπροσωπεύουν έναν, εξελικτικά, αρχαίο μηχανισμό επιγενετικής γονιδιακής ρύθμισης. Επίσης, είναι μία από τις περισσότερο συντηρημένες ομάδες γονιδίων, με μερικά από αυτά να έχουν συντηρηθεί τέλεια (σε επίπεδο τόσο νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, όσο και προτύπου

έκφρασης), από τους νηματώδεις και τα αρθρόποδα μέχρι τους ανθρώπους. (A.E. Pasquinelli, 2000) Δεδομένου ότι, η συντηρητικότητα μιας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στο πέρασμα του εξελικτικού χρόνου, υποδεικνύει και το μέγεθος της σημασίας της, τα miRNAs, σύντομα μετά την ανακάλυψή τους, αναγνωρίστηκαν ως δυνητικά σημαντικά μόρια ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης ενός ευρέος φάσματος φύλων. (V. Ambros, 2001; R.C. Lee and V. Ambros, 2001; M. Lagos-Quintana, 2001) Προς το παρόν, έχουν ανακαλυφθεί περισσότερα από τριάντα χιλιάδες miRNAs σε τουλάχιστον διακόσια έξι είδη. Περίπου τα μισά από τα γονίδια που κωδικοποιούν miRNA μόρια εντοπίζονται ως ανεξάρτητες μεταγραφικές μονάδες, ενώ άλλα είναι παρόντα στο εσωτερικό αλληλουχιών ιντρονίων, που ανήκουν σε γονίδια τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες. (H.K. Saini, 2008.) Επίσης, κάποια miRNAs σχηματίζουν συμπλέγματα γονιδίων, στα οποία μεταγράφονται περισσότερα από ένα είδη miRNAs, από μία μεταγραφική μονάδα (πολυσιστρονικά miRNAs). Η έκφραση ορισμένων miRNAs πραγματοποιείται αυστηρά σε συγκεκριμένα όργανα ή ιστούς, αν και η πλειονότητα εκφράζεται ευρέως. (D. P. Bartel, 2009)

Σήμερα, έχει εδραιωθεί η άποψη ότι, τα miRNAs διαδραματίζουν σημαντική λειτουργία στη φυσιολογική ανάπτυξη, μέσω της ρύθμισης της έκφρασής τους, καθώς και στις ασθένειες, στις οποίες η έκφρασή τους διαταράσσεται. Βάσει ερευνητικών δεδομένων, δείχθηκε ότι, η στοχευμένη πειραματική μεταβολή της έκφρασης των miRNAs διακόπτει τη φυσιολογική ανάπτυξη του οργανισμού και προσβάλλει διάφορα όργανα και ιστούς, συμπεριλαμβανομένων της καρδιάς, του εγκεφάλου, των πνευμόνων, του δέρματος και του ανοσοποιητικού συστήματος. (E. Sonkoly, 2008; D. Catalucci, 2008; C. Xiao, 2008; A. Ventura, 2008)

A.7.2. Η βιογένεση των microRNAs

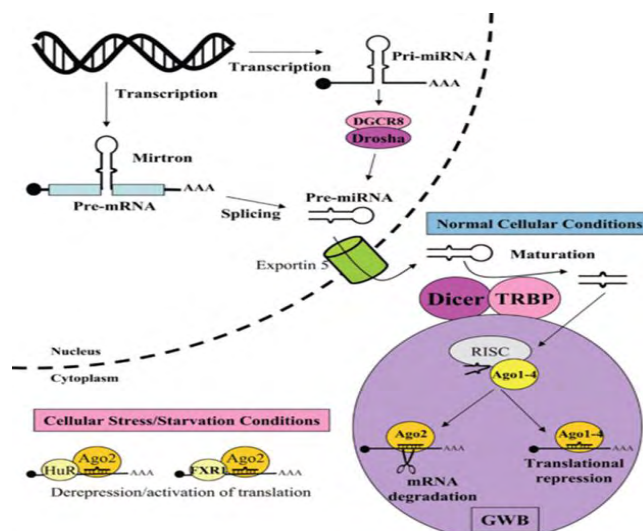
Τα miRNAs μεταγράφονται στον πυρήνα από την RNA πολυμεράση II (RNA polymerase II) και αρχικά σχηματίζεται ένα μεγάλο σε μήκος μετάγραφο, που καλείται πρωτογενές miRNA (pri-miRNA). Στη συνέχεια, το pri-miRNA αναγνωρίζεται και επεξεργάζεται από ένα σύμπλοκο που δομείται από το ένζυμο Drosha, το οποίο έχει ενεργότητα RNAάσης III, και από την πρωτεΐνη DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8) και η επεξεργασία αυτή, αποδίδει ένα RNA μόριο, γνωστό ως πρόδρομο miRNA (pre-miRNA). Το pre-miRNA έχει μήκος 70-90 νουκλεοτίδια και διαθέτει, επίσης, μία ατελή δομή φουρκέτας στο ένα άκρο του (stem loop hairpin structure). Έπειτα, το pre-miRNA μεταφέρεται από τον πυρήνα στο κυτόπλασμα μέσω της πρωτεΐνης, εξπορτίνη 5, με ένα μηχανισμό που εξαρτάται από την πρωτεΐνη Ran και το τριφωσφορικό νουκλεοτίδιο της γουανίνης (GTP) (Εικόνα 6). (Xi Chen, 2012)

Μετά την έξοδό του από τον πυρήνα, το pre-miRNA επεξεργάζεται από ένα σύμπλοκο που συνίσταται από το ένζυμο Dicer, το οποίο επίσης διαθέτει ενεργότητα RNAάσης III, καθώς και από την πρωτεΐνη TRBP (Transactivation-responsive RNA-binding protein), αποδίδοντας, εν τέλει, ένα μικρό, δίκλωνο μόριο RNA, στο οποίο η μία αλυσίδα αντιπροσωπεύει την ώριμη αλυσίδα του miRNA και η άλλη τη συμπληρωματική της. (D. P. Bartel, 2004; V. Ambros 2004; V. N. Kim, 2009) Επακόλουθα, το δίκλωνο miRNA, ξετυλίγεται από μία RNA ελικάση και το μονόκλωνο ώριμο miRNA ενσωματώνεται στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο RISC (RNA-induced silencing complex). Στη συνέχεια, το σύμπλοκο miRNA/RISC προσδένεται σε συμπληρωματικές αλληλουχίες στο mRNA-στόχο και κυρίως στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (3' Untranslated region, 3'-UTR) του, αναστέλλοντας την έκφρασή του με δύο διαφορετικούς μηχανισμούς. (Xi Chen, 2012)

A.7.3. Ο μηχανισμός της γονιδιακής αποσιώπησης μέσω των microRNAs

Οι δύο κατασταλτικοί μηχανισμοί των miRNAs διεκπεραιώνονται μέσω της πρόσδεσης μίας αλληλουχίας δύο έως επτά νουκλεοτιδίων στην 5' περιοχή του miRNA μορίου (seed region), σε συμπληρωματικές αλληλουχίες που εδράζονται στην 3'-UTR των mRNA-στόχων (αν και έχει βρεθεί ότι κι άλλες νουκλεοτιδικές περιοχές του miRNA ενδέχεται να ασκούν παρόμοια δράση) και είναι οι εξής:

- ❖ Τέλεια συμπληρωματικότητα μεταξύ της αλληλουχίας του miRNA και της συμπληρωματικής περιοχής στο mRNA-στόχο, έχει ως αποτέλεσμα την αποικοδόμηση του mRNA.
- ❖ Ατελής συμπληρωματικότητα μεταξύ των δύο μορίων, οδηγεί στην καταστολή της μετάφρασης του mRNA. (Εικόνα 7) (Bartel 2004; Ambros 2004; V. N. Kim, 2009)



Εικόνα 7. Τα στάδια της βιογένεσης των miRNAs και οι μηχανισμοί γονιδιακής αποσιώπησης

A.7.4. Το ρυθμιστικό δυναμικό των microRNAs

Μία ενδιαφέρουσα πτυχή της γονιδιακής ρύθμισης από τα miRNAs, είναι το γεγονός ότι, ένα μόριο miRNA τυπικά ρυθμίζει την έκφραση εκατοντάδων γονιδίων μέσα σε ένα κυτταρικό τύπο. (M. Selbach, 2008; D. Baek, 2008) Περαιτέρω, κάθε mRNA μπορεί να ρυθμιστεί από πολλά miRNAs (ανάλογα με το μήκος της 3'-UTR), τα οποία ενδέχεται να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με συνέργεια ή ανταγωνισμό. Σήμερα, έχουν εντοπιστεί στο ανθρώπινο γονιδίωμα περισσότερα από εφτακόσια γονίδια που εκφράζουν miRNAs και μία πρόβλεψη είναι ότι, σε πολλούς κυτταρικούς τύπους, συμπεριλαμβανομένων των ανοσοποιητικών κυττάρων, ποσοστό μεγαλύτερο από το 30% όλων των ανθρώπινων γονιδίων ρυθμίζεται από τη δράση των miRNAs. (L. A. Yates, 2013; D. P. Bartel, 2009; R. Fabian, 2010.) Συμπερασματικά, η συμβολή των miRNAs στην επιγενετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης των κυττάρων, είναι δυνητικά υπερμεγέθης. (R.C. Friedman, 2009.)

A.8. Η σχέση μεταξύ της ρυθμιστικής δράσης των miRNAs στη γονιδιακή έκφραση και της παθογένεσης των λοιμώξεων.

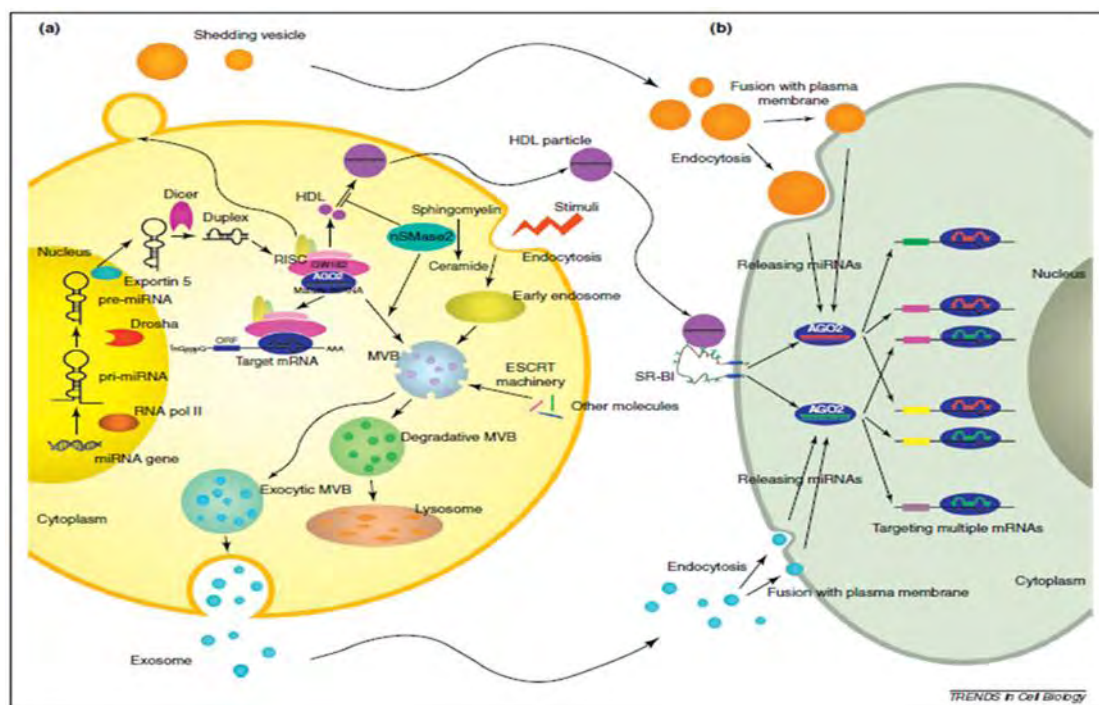
Τα miRNAs διαδραματίζουν εξέχοντα ρόλο κατά τη λοίμωξη με διάφορα παθογόνα, όπως οι ιοί, τα παράσιτα και τα βακτήρια. (Eulalio A, 2012; Staedel C, 2013; Cullen B.R., 2011) Συγκεκριμένα πειράματα αποκάλυψαν τη δυνατότητα ορισμένων DNA ιών να εκφράζουν πολλαπλά miRNAs, στα κύτταρα που έχουν μολύνει, ελέγχοντας, έτσι, τα επίπεδα τόσο των ιικών, όσο και των κυτταρικών mRNAs, και ως εκ τούτου, να επηρεάζουν την ιική αντιγραφή και την παθογένεση της λοίμωξης. (Cullen B.R., 2011) Επιπροσθέτως των miRNAs που εκφράζονται από τους ιούς, έχουν ταυτοποιηθεί και κυτταρικά miRNAs του ξενιστή, τα οποία, μέσω της ρυθμιστικής

τους λειτουργίας, είτε καταστέλλουν, είτε ενισχύουν την αντιγραφή διαφορετικών ιών. (Claire Maudet, 2014)

Στο πεδίο των βακτηριακών λοιμώξεων, ο όγκος των πληροφοριών σχετικά με τον αντίκτυπο των βακτηριακών παθογόνων στην έκφραση των miRNAs του ξενιστή, καθώς και με το ρόλο αυτών των miRNAs στη ρύθμιση της βακτηριακής λοίμωξης, είναι σημαντικά μικρότερος. (Claire Maudet, 2014) Η διαταραχή της έκφρασης των miRNAs σε κύτταρα θηλαστικών, έναντι των λοιμώξεων, αποδείχτηκε για πρώτη φορά σε μία πρωτοποριακή μελέτη, η οποία εκτίμησε τα επίπεδα έκφρασης μιας ομάδας διακοσίων (200) miRNAs, σε ανθρώπινα μονοκύτταρα που είχαν ενεργοποιηθεί με το λιποπολυσακχαρίτη (LPS) της βακτηριακής μεμβράνης, ένα συστατικό, το οποίο αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα TLR4. (Taganov K.D., 2006) Τα αποτελέσματά τους έδειξαν υπερ-έκφραση των miR-132, miR-146a/b και miR-155. Τα ευρήματα αυτά, καθώς και μεταγενέστερες έρευνες, απέδειξαν ότι, τα miR-146 και miR-155 είχαν την ικανότητα καταστολής της έκφρασης mRNAs, οι πρωτεΐνες των οποίων συμμετείχαν στο σηματοδοτικό μονοπάτι καθοδικά του TLR4. Συνεπώς, κατέληξαν σε ένα μοντέλο, στο οποίο, αυτά τα δύο miRNAs είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία ενός αρνητικού αναδραστικού ελέγχου, προκειμένου να επιτευχθεί η προστασία των κυττάρων του ξενιστή από τις δυσμενείς επιπτώσεις μίας ενδεχόμενης, παρατεταμένης απόκρισης του σηματοδοτικού καταρράκτη του TLR4. (Claire Maudet, 2014)

A.9. Τα εξωκυττάρια microRNAs ως δυνητικοί βιοδείκτες ασθενειών

Παρ' όλο ότι η πλειοψηφία των miRNAs εντοπίζεται σε ενδοκυτταρικό επίπεδο, έχει παρατηρηθεί ένας σημαντικός αριθμός διαφόρων τύπων miRNAs και στο εξωκυττάριο περιβάλλον. (Alton Etheridge, 2011) Πρόσφατα, αποδείχτηκε ότι, τα miRNAs απελευθερώνονται στην κυκλοφορία από διάφορα όργανα ή ιστούς (Weber JA, 2010) και ότι, το ιδιοσυστατικό προφίλ των εκκρινόμενων αυτών miRNAs, ενδέχεται να μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια διαφόρων παθολογικών καταστάσεων αυτών των οργάνων ή ιστών. Θεωρείται ότι, τα εξωκυττάρια miRNAs διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων, *in vivo*, καθώς μπορούν να προσληφθούν από άλλα κύτταρα, διαμεσολαβώντας, κατ' αυτόν τον τρόπο, στη διακυτταρική επικοινωνία (Εικόνα 8). (Rayner KJ, 2013)



Εικόνα 8. Τα εξωκυττάρια miRNAs συμβάλλουν στη διακυτταρική επικοινωνία

A.9.1. Η ανθεκτικότητα των microRNAs στις RNAάσες των βιολογικών υγρών

Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των εκκρινόμενων miRNAs είναι ότι, οι μικρές σε μήκος αλληλουχίες τους εμφανίζουν αξιοσημείωτη σταθερότητα, σε σύγκριση με τη σταθερότητα που επιδεικνύουν οι αλληλουχίες των mRNAs. Έτσι, σε δείγματα ορού και πλάσματος, καθώς και σε άλλα βιολογικά υγρά, όπως τα ούρα και το σάλιο, εντοπίστηκαν, πρόσφατα, εξωκυττάρια miRNAs με ιδιαίτερη ανθεκτικότητα στην αποικοδόμηση από τις διάφορες RNAάσες των βιολογικά αυτών υγρών. (Shuangli Mi, 2013)

Η σταθερότητα που παρουσιάζουν τα miRNAs απέναντι στις RNAάσες των βιολογικών υγρών, αποδείχτηκε ότι, οφείλεται σε συγκεκριμένες δομές που σχηματίζουν τα miRNAs σε συνεργασία με άλλα μόρια. Πρόσφατες ερευνητικές μελέτες, αποκάλυψαν ότι, τα εξωκυττάρια miRNAs εσωκλείονται σε τρεις τύπους μικρών, εκκρινόμενων μεμβρανικών κυστιδίων: τα εξωσώματα, τα μικροκυστίδια και τα απεκκρινόμενα κυστίδια. Τα μικροκυστίδια και τα εξωσώματα είναι λιπιδικά κυστίδια, διαμέτρου 50 έως 1000 nm (Ratajczak J, 2006) και 30 έως 100 nm (Keller S, 2006), αντίστοιχα. Τα απεκκρινόμενα κυστίδια, αποτελούν έναν ετερογενή πληθυσμό που περιλαμβάνει μεγαλύτερα κυστίδια, διαμέτρου 100 έως 1000 nm (E. Cocucci, 2009) τα οποία εκκρίνονται από το κύτταρο, προσλαμβάνοντας συγχρόνως ένα τμήμα της πλασματικής του μεμβράνης. (Shuangli Mi, 2013)

A.9.1.1. Τα εξωσώματα

Τα εξωσώματα, πριν απελευθερωθούν στο εξωκυττάριο περιβάλλον, περιέχονται σε μία άλλη μεμβρανική δομή, τα πολυκυστιδιακά σωμάτια, τα οποία, είτε οδηγούνται για αποικοδόμηση, μέσω σύντηξης της μεμβράνης τους με τη μεμβράνη των λυσοσωμάτων, είτε εκκρίνονται στον εξωκυττάριο χώρο (μαζί με τα εξωσώματα που εσωκλείουν), μέσω σύντηξης της μεμβράνης τους με την πλασματική μεμβράνη του κυττάρου. Κεντρικό ρόλο στη συσσώρευση των εξωσωμάτων, τα οποία προορίζονται για αποικοδόμηση στα λυσοσώματα, διαδραματίζει ένα καλά μελετημένο πρωτεϊνικό σύμπλοκο, το ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) (Εικόνα 8). (Hurley J.H., 2008; Williams R.L., 2007) Αντίθετα, η ενσωμάτωση εξωσωμάτων στα πολυκυστιδιακά σωμάτια που προορίζονται για απελευθέρωση στον εξωκυττάριο χώρο, γίνεται με μια διαδικασία που δεν εξαρτάται από το σύμπλοκο ESCRT, αλλά ενεργοποιείται από τον «εξαρτώμενο από τη σεραμίδη εκκριτικό μηχανισμό» (Εικόνα 8). (Kosaka N, 2010) Επίσης, υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι, η έγκλειση των miRNAs στο εσωτερικό των εξωσωμάτων, ίσως να μην είναι μια τυχαία διαδικασία, αλλά αντίθετα, ελέγχεται από εξειδικευμένες πρωτεΐνες του συμπλόκου γονιδιακής αποσιώπησης, RISC. (Gibbings D.J., 2009) Σε συμφωνία με αυτή την υπόθεση, έρχονται τα αποτελέσματα ερευνητικής μελέτης, που έδειξαν ότι, η πρωτεΐνη Ago2 (Argonaute 2), η οποία αποτελεί συστατικό του συμπλόκου RISC, εντοπίστηκε σε εξωσώματα που προέρχονταν από καλλιεργούμενα THP-1 κύτταρα. (Zhang Y.J., 2010) Τα ευρήματα αυτά, προτείνουν ότι, τα εξωσώματα δε μεταφέρουν μόνο miRNAs, αλλά και κυτταρικά συστατικά του συμπλόκου RISC, τα οποία ενισχύουν τη δράση των miRNAs επί συγκεκριμένων mRNA-στόχων. Επίσης, εξαιτίας της παρουσίας αυτής της πρωτεΐνης στα εξωσώματα, θεωρείται πιθανό το σύμπλοκο RISC να εμπλέκεται στην ενσωμάτωση των miRNAs στο εσωτερικό τους. (Xi Chen, 2012) Η θεώρηση ότι, τα εξωκυττάρια miRNAs προστατεύονται από μεμβρανικά κυστίδια, ενισχύθηκε και από τα αποτελέσματα των δύο παρακάτω επιστημονικών ομάδων. (Shuangli Mi, 2013) Η ομάδα του Valadi H. και των συνεργατών του, εντόπισε αρκετές περιπτώσεις επιλεκτικής ενσωμάτωσης miRNAs στο εσωτερικό εξωσωμάτων (Valadi H, 2007) και αυτή του Hunter MP και των συνεργατών του, ανίχνευσε miRNAs μέσα σε μικροκυστίδια που είχαν απομονωθεί από ανθρώπινο περιφερικό αίμα. (Hunter MP, 2008)

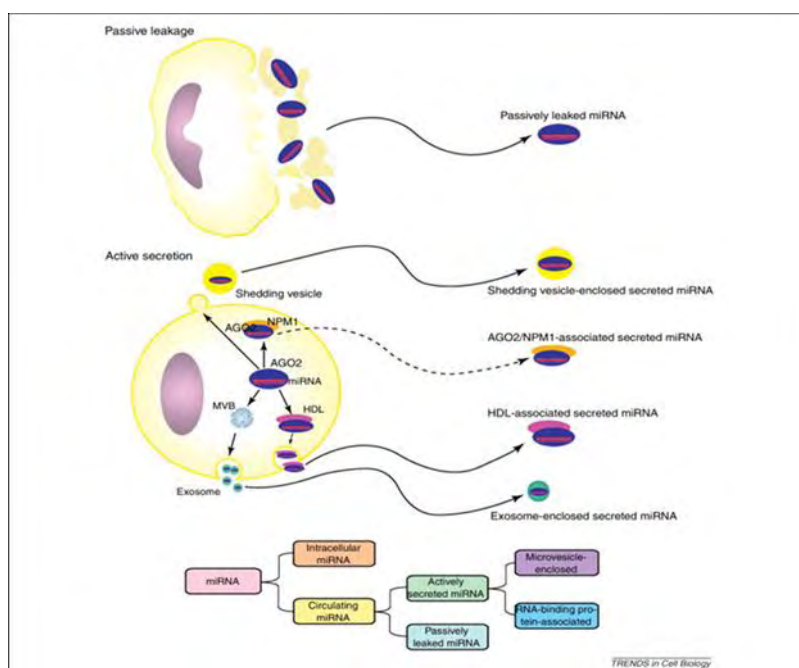
A.9.1.2. Τα σωματίδια υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών

Αποτελέσματα ερευνητικών μελετών, έδειξαν ότι, τα miRNAs εντοπίζονται και στο εσωτερικό αποπρωτικών σωματίων ή σωματιδίων υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (High Density Lipoproteins, HDLs) (Εικόνα 8). (Shuangli Mi, 2013)

Αξίζει να σημειωθεί ότι, η πρωτεΐνη, ουδέτερη σφιγγομυελινάση 2, και πιθανώς, το εκκριτικό μονοπάτι που ρυθμίζεται από τη σεραμίδη, φάνηκε να καταστέλλουν την εξωκυτάρια μεταφορά των miRNAs με φορέα τα σωματίδια HDL. (Vickers KC, 2011; Zernecke A, 2009) Επειδή, όπως προαναφέρθηκε, η ενεργοποίηση του εκκριτικού μηχανισμού της σεραμίδης, έχειδειχθεί ότι κινητοποιεί την απελευθέρωση εξωσωμάτων από τα κύτταρα, ίσως, η μεταφορά συγκεκριμένων miRNAs στο εξωκυττάριο περιβάλλον, μέσω εξωσωμάτων, ή μέσω σωματιδίων υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών, να αποτελούν δύο ξεχωριστούς μηχανισμούς και πιθανότατα ανταγωνιστικούς μεταξύ τους. (Xi Chen, 2012)

A.9.1.3. Οι πρωτεΐνες Ago2 (Argonaute 2) και NMP1 (Nucleophosmin 1)

Έρευνες, έχουν δείξει ότι, ένα σημαντικό μέρος των εξωκυττάρια miRNAs στο πλάσμα δεν εντοπίζεται εγκλεισμένο σε μικροκυστίδια, αλλά συνδεδεμένο με την πρωτεΐνη Ago2. (Turchinovich A, 2011; Arroyo J.D., 2011) Επίσης, συνδεδεμένη με εξωκυττάρια miRNAs βρέθηκε και η NMP1, μία ακόμη πρωτεΐνη που παρουσιάζει ικανότητα πρόσδεσης με RNA. (Wang K, 2010) (Εικόνα 9)



Εικόνα 9. Το προτεινόμενο μοντέλο έκκρισης των miRNAs

Ωστόσο, δεν υπάρχουν άμεσα δεδομένα, σχετικά με το αν τα εξωκυττάρια miRNAs που εντοπίζονται συνδεδεμένα με αυτές τις πρωτεΐνες, εκκρίνονται ενεργά από τα κύτταρα, καθώς και για το αν προσλαμβάνονται από γειτονικά κύτταρα-δέκτες.

Επομένως, το αν τα συγκεκριμένα miRNAs προέρχονται από τη λύση των κυττάρων, από κατεστραμμένα κυστίδια ή εκκρίνονται από τα κύτταρα με ένα μηχανισμό που δεν εξαρτάται από κυστίδια, είναι ερωτήματα που δεν έχουν απαντηθεί και απαιτούνται περισσότερες έρευνες προς αυτήν την κατεύθυνση. (Xi Chen, 2012)

A.9.2. Παθητική έκκριση των miRNAs

Θεωρείται ότι, τα εξωκυττάρια miRNAs που εντοπίζονται στο εσωτερικό εξωσωμάτων, κυστιδίων HDL, καθώς και ως συμπλέγματα με πρωτεΐνες Argonaute/NMP, είναι αποτέλεσμα των μηχανισμών ενεργούς έκκρισης. (Shuangli Mi, 2013) Ωστόσο, ένας επιπρόσθετος μηχανισμός έκκρισης που προτείνεται, είναι η παθητική διαρροή των miRNAs κατά τη διάρκεια της απόπτωσης των κυττάρων, ή μετά από τη διακοπή της ενότητας της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου, (Shuangli Mi, 2013) υπόθεση, η οποία υποστηρίζεται από το γεγονός του εντοπισμού του εξειδικευμένου για την καρδιά, miR-208, στον ορό ατόμων με τραυματισμό στον καρδιακό ιστό (Εικόνα 9). (Ji X, 2009)

A.10. Τα χαρακτηριστικά του ιδανικού βιοδείκτη και ποια από αυτά διαθέτουν τα εξωκυττάρια miRNAs

Ο ιδανικός βιοδείκτης θα πρέπει να εκπληροί έναν αριθμό προϋποθέσεων προκειμένου να καταστεί εφικτή η χρήση του στην κλινική πρακτική. Συνεπώς, η εφαρμογή του θα πρέπει να υποστηρίζεται από μη επεμβατικές μεθόδους. Επίσης, είναι απαραίτητη η ειδικότητά του για την ασθένεια ή την παθολογική κατάσταση που πρέπει να διερευνηθεί, όπως και η αξιοπιστία του, στην περίπτωση που αποτελεί ένδειξη για την παρουσία μίας νόσου πριν εκδηλωθούν τα πρώιμα συμπτώματα. Επιπροσθέτως, απαιτείται η ευαισθησία του σε ενδεχόμενες μεταβολές της παθολογίας μιας ασθένειας (ανταπόκριση στην εξέλιξη ή τη θεραπεία της νόσου), καθώς και η δυνατότητα να μπορεί να εφαρμοστεί τόσο σε ζωικά μοντέλα προσομοίωσης της νόσου, όσο και σε ανθρώπους. (Alton Etheridge, 2011)

Τα εξωκυττάρια miRNAs διαθέτουν πολλά από τα προαπαιτούμενα χαρακτηριστικά ενός ιδανικού βιοδείκτη. Όπως προαναφέρθηκε, η αλληλουχία των miRNAs είναι συντηρημένη μεταξύ των διαφορετικών ειδών, παρουσιάζει αξιοσημείωτη σταθερότητα στα διάφορα βιολογικά υγρά, και επιπλέον, είναι δυνατή η απομόνωσή τους από αυτά, κάτι το οποίο μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση μη επεμβατικών μεθόδων. Επιπλέον, κάποια miRNAs εκφράζονται ειδικά σε συγκεκριμένους ιστούς ή σε συγκεκριμένα στάδια βιολογικών διεργασιών των κυττάρων και τα εκφραστικά τους επίπεδα μπορούν εύκολα να εκτιμηθούν με διάφορες

μεθόδους, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR) (Alton Etheridge, 2011), ενδυναμώνοντας, επομένως, την πιθανότητα να αποτελέσουν μη επεμβατικούς βιοδείκτες, με ευαισθησία στην πρόγνωση και τη διάγνωση ασθενειών, καθώς και στην αξιολόγηση του σταδίου στο οποίο βρίσκεται μία, εν εξελίξει, ασθένεια. (Shuangli Mi, 2013)

A.11. Μελέτες διερεύνησης των εξωκυττάρων miRNAs ως βιοδείκτες μικροβιακών λοιμώξεων

Δεδομένου ότι, πλέον, είναι ξεκάθαρο το γεγονός πως τα miRNAs αναλαμβάνουν σημαντική δράση στις περιπτώσεις μικροβιακών λοιμώξεων, μέσω της ρυθμιστικής τους επίδρασης στη γονιδιακή έκφραση· μέχρι σήμερα, έχει πραγματοποιηθεί ένας αριθμός ερευνητικών μελετών, προκειμένου να διερευνηθεί η εκφραστική διαταραχή συγκεκριμένων ενδοκυτταρικών miRNAs, σε παθολογικούς ιστούς ασθενών με λοίμωξη, και επιπροσθέτως, η ρυθμιστική επίδραση αυτών των miRNAs στην εξέλιξη της λοίμωξης.

Συνεπώς, σε ό,τι αφορά στη ρυθμιστική δράση του miR-21, σε ενδοκυτταρικό επίπεδο, έχει βρεθεί ότι παρεμποδίζει την αντι-ϊική δράση των ιντερφερονών σε ασθενείς με λοιμώξεις από τον ιό HCV (Hepatitis C Virus), προωθώντας, κατ' αυτόν τον τρόπο, την αντιγραφή του. Η επιστημονική ομάδα του Yanni Chen και των συνεργατών του, ανέλυσε το προφίλ έκφρασης του miR-21 σε ανθρώπινα ηπατοκύτταρα, κατά τη λοίμωξη με τον ιό HCV, και βρήκαν ότι στη λοίμωξη από το συγκεκριμένο ιό, η έκφρασή του αυξάνεται σημαντικά. Έπειτα, βρήκαν ότι, το συγκεκριμένο miRNA καταστέλλει την έκφραση των πρωτεϊνών MyD88 και IRAK1 στα ηπατοκύτταρα, με αποτέλεσμα τη μη έκφραση των γονιδίων των IFNs-I, την καταστολή της αντι-ϊικής απόκρισης που μεσολαβείται από αυτές, και ως εκ τούτου, την προώθηση της αντιγραφής του ιού. (Yanni Chen, 2013)

Η ερευνητική ομάδα του Zhu B και των συνεργατών του, μελέτησε τη σχέση ανάμεσα στη διαφοροποιημένη έκφραση του miR-16 σε ασθενείς με λοίμωξη από τον ιό HCV και στην έκφραση των πρωτεϊνών HGF και Smad7, κατά την ανάπτυξη ηπατικής ίνωσης, δεδομένου ότι, ο HCV εμπλέκεται στην έναρξη και στην εξέλιξή της. Στην έρευνα που διεξήγαγαν, εντόπισαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του miR-16 σε ασθενείς με λοίμωξη από τον HCV. Περαιτέρω, βασιζόμενοι σε βιοπληροφορικές αναλύσεις, έδειξαν ότι, οι πρωτεΐνες HGF και Smad7 ήταν προβλεπόμενοι στόχοι του miR-16. Επίσης, η εκφραστική αύξηση του miR-16 και η μείωση της έκφρασης των δύο αυτών πρωτεϊνών, αποδείχτηκε και στην κυτταρική σειρά QSG-7701, η οποία είχε

μολυνθεί με τον ιό Ad-HCV (μία κατασκευή ανασυνδυασμένου αδενοϊού που εξέφραζε την κύρια πρωτεΐνη του ιού HCV). (Zhu B, 2015)

Σε ό,τι αφορά στον ενδοκυτταρικό ρόλο της εκφραστικής διαφοροποίησης του miR-223, τα αποτελέσματα της έρευνας του Chen Luoquan και των συνεργατών του, αποκάλυψαν, για πρώτη φορά, ένα νέο μηχανισμό, κατά τον οποίο το miR-223 ρυθμίζει την παραγωγή των IFNs-I κατά την έμφυτη, αντι-ϊική ανοσολογική απόκριση, έναντι της λοίμωξης από τον ιό VSV (Vesicular Stomatitis Virus). (Chen Luoquan, 2016) Ειδικότερα, απέδειξαν ότι, η εκφραστική αύξηση του miR-223 ρυθμίζει θετικά την παραγωγή των IFNs-I, κυρίως μέσω της καταστολής της έκφρασης της FOXO3, γεγονός, το οποίο ενισχύει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα των ιντερφερονών, IRF7. Η κυριότερη δράση του IRF7, είναι η ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων των IFNs-I, συμπεριλαμβανομένου του γονιδίου της IFN-β, καθώς και έναν αριθμό γονιδίων των IFNs-α. (Honda K, 2005; Sato M, 2000; Sato M, 1998; Marie I, 1998)

Σχετικά με την ενδοκυτταρική λειτουργία του miR-125b στις λοιμώξεις, απεδείχθη η συμβολή του στην καταστολή της φλεγμονώδους απόκρισης, στη λοίμωξη από το *Brucella abortus*, και στην επακόλουθη επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού. Η πρωτεΐνη A20, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο TNFAIP3, αποτελεί έναν αναστολέα της φλεγμονής, κυρίως, ως αναστολέας της ενεργοποίησης του σηματοδοτικού καταρράκτη NF-kB. Δεδομένου ότι, ο μεταγραφικός παράγοντας NF-kB είναι ένας επιφανής ρυθμιστής της επαγωγής των μακροφάγων (Karin M, 2006), η επιστημονική ομάδα του Ning Liu και των συνεργατών του, διερεύνησε τον πιθανό ρόλο του miR-125b στην ενδοκυτταρική επιβίωση του βακτηρίου *Brucella abortus*, σε μακροφάγα που έχουν προσβληθεί από το εν λόγω βακτήριο, καθώς η πρωτεΐνη A20 αποτελεί ένα από τα γονίδια-στόχους του συγκεκριμένου miRNA. Απέδειξαν λοιπόν ότι, η μείωση της έκφρασης του miR-125b κατά τη λοίμωξη με το *B. abortus*, είχε ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της έκφρασης της A20, και ως εκ τούτου, την καταστολή της ενεργοποίησης του NF-kB και την επακόλουθη εδραίωση της επιβίωσης του συγκεκριμένου βακτηρίου στο εσωτερικό των μακροφάγων. (Ning Liu, 2016)

Για τα miR-19a και miR-19b, έχει αποδειχθεί η εμπλοκή τους στη ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης στην περίπτωση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Η επιστημονική ομάδα του L. Philippe και των συνεργατών του, διερεύνησε την πιθανή δράση των miR-19a και miR-19b στη ρευματοειδή αρθρίτιδα και έδειξε ότι, η ενεργοποίηση των FLS κυττάρων σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα, μέσω της έκθεσής τους σε BLP και LPS, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης των miR-19a και miR-19b, καθώς και ότι, το γεγονός αυτό συνοδεύεται από την αύξηση της

έκφρασης του TLR2 από τα κύτταρα αυτά. Περαιτέρω, απέδειξαν ότι, τα mRNAs των TLR2 αποτελούν άμεσους στόχους των miR-19a και miR-19b και μάλιστα ότι, η καταστολή της έκφρασής τους πραγματοποιείται στο επίπεδο αναστολής της μετάφρασης. Επιπλέον, στην ίδια έρευνα, έδειξαν ότι, η δράση των miR-19a και miR-19b ρυθμίζει αρνητικά την παραγωγή της IL-6, διότι η υπερ-έκφρασή τους οδήγησε σε ισχυρή απομείωση της σύνθεσής της, σε FLS κύτταρα ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα, τα οποία είχαν ενεργοποιηθεί λόγω έκθεσης σε BLP. (L. Philippe, 2012) Επίσης, το miR-19b, ενέχεται και στη ρύθμιση της φλεγμονής κατά τη λοίμωξη από τον ιό JEV (Japanese Encephalitis Virus). Η επιστημονική ομάδα του U. Ashraf και των συνεργατών του, απέδειξε την εμπλοκή του miR-19b στη ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης κατά τη λοίμωξη από τον JEV, *in vitro* και *in vivo*. Τα δεδομένα που εξήγαγαν έδειξαν ότι, το συγκεκριμένο miRNA υπερεκφράζεται σε κύτταρα καλλιέργειας και σε ιστούς εγκεφάλου ποντικού, κατά τη λοίμωξη από τον ιό αυτό. Συγκεκριμένα, βρήκαν ότι, η υπερ-έκφραση του miR-19b οδήγησε σε αυξημένη παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών, συμπεριλαμβανομένων των TNFα, IL-6 και IL-1, μετά τη λοίμωξη από τον ιό JEV, ενώ η υπο-έκφρασή του είχε τα ακριβώς αντίθετα αποτελέσματα. Σε επίπεδο μηχανισμού, παρατήρησαν ότι, το miR-19b ρυθμίζει τη φλεγμονώδη απόκριση που προκαλείται από την εν λόγω λοίμωξη, μέσω καταστολής της έκφρασης της πρωτεΐνης RNF11 (Ring finger protein 11), η οποία αποτελεί έναν αρνητικό ρυθμιστή του σηματοδοτικού καταρράκτη NF-κB. Επιπλέον, έδειξαν ότι, η *in vivo* αποσιώπηση της δράσης του miR-19b, οδήγησε στην ανανέωση των εκφραστικών επιπέδων της πρωτεΐνης RNF11, η οποία, με τη σειρά της, μείωσε την παραγωγή των φλεγμονωδών κυτοκινών. (Usama Ashraf, 2016)

Όπως αποδείχτηκε με τις παραπάνω έρευνες, η διαταραχή της έκφρασης των miRNAs σε ενδοκυτταρικό επίπεδο, ενέχεται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις λοιμωδών ασθενειών. Η επιστημονική ομάδα του Lawrie και των συνεργατών του, εισήγαγε, για πρώτη φορά, την ιδέα ότι, τα εξωκυττάρια miRNAs θα μπορούσαν να αποτελέσουν δυνητικούς βιοδείκτες ασθενειών, όταν σύγκριναν τα επίπεδα συγκεκριμένων miRNAs του ορού, ασθενών με B κυτταρικό λέμφωμα, με τα αντίστοιχα επίπεδά τους στον ορό υγιών ατόμων. (Lawrie CH, 2008) Κατά συνέπεια, έκτοτε, έχουν διεξαχθεί ερευνητικές μελέτες προσδιορισμού των εκφραστικών επιπέδων διαφόρων εξωκυττάρια miRNAs σε βιολογικά υγρά, σε περιπτώσεις ασθενών με λοίμωξη, υποστηρίζοντας, κατ' αυτόν τον τρόπο, τη δυνητική εφαρμογή των μορίων αυτών ως βιοδείκτες μικροβιακών λοιμώξεων.

Σε ό,τι αφορά στη διαφοροποίηση των εκφραστικών επιπέδων του miR-21 στον ορό, έχει προταθεί ως πιθανός βιοδείκτης ηπατικής ασθένειας, η οποία προκαλείται από τη λοίμωξη με τον ιό HCV. Η επιστημονική ομάδα της V. Bihrer και

των συνεργατών της, μελέτησε το προφίλ έκφρασης του συγκεκριμένου miRNA στον ορό, σε ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα σχετιζόμενο με χρόνια λοίμωξη από τον HCV, και σε υγιείς, και διαπίστωσαν αύξηση της έκφρασής του στον ορό των ασθενών, συγκριτικά με την αντίστοιχη έκφρασή του στον ορό των υγιών ατόμων. Επιπροσθέτως, με περαιτέρω αναλύσεις, αποκάλυψαν ισχυρή συσχέτιση των αυξημένων επιπέδων του miR-21 στον ορό, με την ύπαρξη νεκρωτικής φλεγμονώδους διεργασίας στο ήπαρ ασθενών με χρόνια λοίμωξη HCV. Στη συνέχεια, με πολυπαραγοντικές αναλύσεις δεδομένων από ασθενείς με ελάχιστη ή μέτρια, έως ισχυρή νεκρωτική φλεγμονή του ήπατος, συμπέραναν ότι, στην περίπτωση φλεγμονώδους ηπατικής ασθένειας λόγω χρόνιας λοίμωξης με τον HCV, τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του miR-21 στον ορό των ασθενών, θα μπορούσαν να αποβούν χρήσιμη παράμετρος για τη διάκριση των ατόμων με ελάχιστη νεκρωτική ηπατική φλεγμονή, από αυτούς με μέτρια και ισχυρή. (V. Bihrer, 2011)

Αναφορικά με την πιθανότητα εφαρμογής της διαφοροποιημένης έκφρασης των miR-16 και miR-223 στον ορό, ως βιοδεικτών της σήψης και του συνδρόμου συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης (Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS), σχετική μελέτη πραγματοποιήθηκε από την επιστημονική ομάδα του H. Wang και των συνεργατών του. Δεδομένου ότι, τα αποτελέσματα διαφόρων ερευνητικών μελετών που επιχείρησαν να αναπτύξουν βιοδείκτες διαχωρισμού των δύο αυτών παθολογικών καταστάσεων, (Otto GP, 2011; Harbarth S, 2001; Meynaar IA, 2011; Tang BM, 2007) δεν ήταν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά, η προαναφερθείσα ερευνητική ομάδα διερεύνησε την έκφραση των miR-16 και miR-15a στον ορό, σε εκατόν εξήντα έξι (166) σηπτικούς ασθενείς και τριάντα δύο (32) ασθενείς με SIRS. Τα αποτελέσματα της έρευνάς τους έδειξαν ότι, τα επίπεδα των δύο αυτών miRNAs ήταν αυξημένα στον ορό και των δύο ομάδων ασθενών, συγκριτικά με τα αντίστοιχα επίπεδά τους στον ορό υγιών ατόμων. Τελικά, κατέληξαν στο συμπέρασμα, ότι τα miR-16 και miR-15a, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες της σήψης και του SIRS, αν και μόνο το miR-15a εμφανίζει την ικανότητα διαχωρισμού αυτών των δύο παθολογικών καταστάσεων. Ωστόσο, μία άλλη ερευνητική μελέτη, έδειξε ότι, τα επίπεδα των miR-223 και miR-146a στον ορό ασθενών με σήψη, ήταν χαμηλότερα από τα αντίστοιχα επίπεδά τους στον ορό ασθενών με SIRS, καθώς και από αυτά στον ορό υγιών ατόμων. (Wang F, 2010) Αντιθέτως, ο H. Wang και οι συνεργάτες του, σε μια προγενέστερη ερευνητική τους εργασία, μελέτησαν τα επίπεδα του miR-223 στον ορό σηπτικών ασθενών και τα αποτελέσματα που εξήγαγαν έδειξαν αύξηση της έκφρασής του. Συνεπώς, θεώρησαν πιθανό ότι, τα διαφορετικά είδη λοιμώδους σήψης, ενδέχεται να επηρεάζουν τα επίπεδα διαφορετικών miRNAs, σε κάθε

περίπτωση, και γι' αυτό το λόγο διέφεραν τα ποσοστά έκφρασης των εξωκυττάρων miRNAs μεταξύ των ερευνητικών μελετών. (H. Wang, 2012)

Η εκφραστική διαταραχή του miR-125b στον ορό, μελετήθηκε από την ερευνητική ομάδα του F. Xiong και των συνεργατών του, στο πλαίσιο της σύνδεσής της με τη χρόνια ηπατίτιδα, την κίρρωση του ήπατος και το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, τα οποία σχετίζονται με τη λοίμωξη από τον ιό HBV. Αναλυτικότερα, μέτρησαν τα επίπεδα των miR-99, miR-let7c και miR-125b στον ορό, σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα B, με ηπατική κίρρωση σχετιζόμενη με λοίμωξη HBV και ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα σχετιζόμενο με λοίμωξη HBV, και στη συνέχεια, σύγκριναν τα επίπεδά τους με τα αντίστοιχα σε υγιή άτομα. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν αύξηση των επιπέδων των miR-99 και miR-125b και στις τρεις ομάδες ασθενών, συγκριτικά με την ομάδα των υγιών ατόμων. Με περαιτέρω αναλύσεις απέδειξαν, τελικά, ότι, τα miR-99 και miR-125b μπορούν να αποτελέσουν δυνητικούς βιοδείκτες πρώιμης διάγνωσης του σχετιζόμενου με λοίμωξη HBV, ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, ακόμη και κατά το στάδιο της χρόνιας ηπατίτιδας B. (Fang Xiong, 2016)

Σχετικά με τη διαφοροποίηση της έκφρασης του miR-19a στον ορό, η επιστημονική ομάδα του T. Motawi και των συνεργατών του, διερεύνησε το ενδεχόμενο εφαρμογής του ως βιοδείκτη στην περίπτωση του, σχετιζόμενου με τη λοίμωξη από HCV, ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Η πρόοδος της χρόνιας λοίμωξης με HCV περιλαμβάνει διάφορα στάδια και η συνηθέστερη κλινική οδός είναι η εξέλιξη της ηπατικής ίνωσης σε κίρρωση και τελικά σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. (Lok AS, 2009) Ο T. Motawi και οι συνεργάτες του, αποκάλυψαν αύξηση των επιπέδων του miR-19a στον ορό ασθενών με χρόνια λοίμωξη HCV, συγκριτικά με τα αντίστοιχα επίπεδά του στον ορό υγιών ατόμων. Η περαιτέρω ανάλυση των επιπέδων του, εντός της ομάδας των ασθενών με χρόνια λοίμωξη HCV, έδειξε μία σταδιακή μείωση των επιπέδων του κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της ηπατικής ίνωσης σε κίρρωση, και περαιτέρω μείωσή τους στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, υποδεικνύοντας ότι, η παρακολούθηση των επιπέδων του θα μπορούσε να έχει κλινική σημασία, ως ένα εργαλείο παρακολούθησης αυτής της εξέλιξης. (Tarek K. Motawi, 2015)

Στην περίπτωση της πνευμονικής φυματίωσης, η οποία προκαλείται από τη λοίμωξη με το *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), η επιστημονική ομάδα του Q. Song και των συνεργατών του, διερεύνησε τη σχέση ανάμεσα στην εκφραστική διαφοροποίηση στον ορό, καθώς και ενδοκυτταρικά, της IL-6 και του miR-365. Η συγκεκριμένη ερευνητική ομάδα, αρχικά, ανίχνευσε αυξημένα επίπεδα της IL-6 στον ορό, στα μακροφάγα των πνευμόνων και στα μονοκύτταρα του αίματος, σε ασθενείς με λοίμωξη από Mtb, τόσο σε επίπεδο mRNA, όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Στη συνέχεια, μελέτησαν τον πιθανό ρόλο του miR-365 στη ρύθμιση της

φλεγμονής στην ενεργό πνευμονική φυματίωση. Σύμφωνα με βιοπληροφορικές αναλύσεις, υπέθεσαν ότι, το συγκεκριμένο miRNA ενδεχομένως να ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση της IL-6. Η υπόθεση αυτή ενισχύθηκε και από το γεγονός ότι, το miR-365 εκδηλώνει την αρνητική ρυθμιστική λειτουργία του στην έκφραση της IL-6, σε κύτταρα HEK293 και κύτταρα HELA. (Baeuerle PA, 1994) Επακόλουθα, απέδειξαν ότι, σε μονοπύρηνια κύτταρα του αίματος, ασθενών με ενεργό πνευμονική φυματίωση, το miR-365 υπο-εκφραζόταν, ενώ αντίθετα, η έκφραση της IL-6 ήταν αυξημένη. Παρόμοια τάση στην εκφραστική διαφοροποίηση μεταξύ του miR-365 και της IL-6 εκδηλώθηκε και σε μακροφάγα των πνευμόνων, προτείνοντας, έτσι, ότι, η υπο-έκφραση του miR-365 μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των ανοσιακών αποκρίσεων, μέσω της επακόλουθης αύξησης της έκφρασης της IL-6. Επίσης, διερεύνησαν και το ενδεχόμενο διαφοροποίησης των εκφραστικών επιπέδων του miR-365 στον ορό των ασθενών και διαπίστωσαν στατιστικά σημαντική μείωσή τους, συγκριτικά με τα αντίστοιχα επίπεδα στον ορό υγιών ατόμων. Ωστόσο, παρά τα οφέλη που αποκομίσθηκαν από την έρευνα αυτή, σχετικά με τη ρυθμιστική δράση του miR-365 στην πνευμονική φυματίωση, απαιτούνται περισσότερα δεδομένα προκειμένου να αποδειχθεί η άμεση σχέση του με τη συγκεκριμένη λοίμωξη και κατ' επέκταση να αποτελέσει βιοδείκτη της εν λόγω ασθένειας. (Qingzhang Song, 2015)

A.12. Σκοπός μελέτης

Η ενδοκυτταρική εκφραστική διαφοροποίηση των miR-21, miR-16, miR-125b, miR-19a, miR-19b, miR-223 και miR-365 έχει συνδεθεί με την έναρξη ή/και την εξέλιξη της έκβασης διαφόρων λοιμώξεων, δεδομένου ότι, τα συγκεκριμένα miRNAs ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη των λοιμώξεων αυτών. Επίσης, η διαφοροποίηση των επιπέδων των miR-21, miR-16, miR-125b, miR-19a, miR-19b, miR-223 και miR-365 στον ορό, σχετίζεται με τη διαφοροποίηση της έκφρασής τους σε ενδοκυτταρικό επίπεδο, και επιπροσθέτως, έχει εφαρμοστεί ως βιοδείκτης ποικίλων λοιμώξεων. Ωστόσο, δεν υπάρχουν έρευνες που να αποδεικνύουν τη συμβολή τους στην εκδήλωση λοιμώξεων του μυοσκελετικού συστήματος, όπως και έρευνες, οι οποίες να έχουν επικεντρωθεί στη χρήση τους ως βιοδείκτες των λοιμώξεων αυτού του είδους. Σκοπός της παρούσης εργασίας, συνεπώς, ήταν η διερεύνηση της πιθανότητας, τα συγκεκριμένα miRNAs να αποτελέσουν προγνωστικούς βιοδείκτες λοιμώξεων του μυοσκελετικού συστήματος.

Ειδικότερα, διερευνήθηκαν:

- ❖ Η διαφοροποίηση των επιπέδων των miRNAs στον ορό ατόμων με λοίμωξη γύρω από το εμφύτευμα, από το βακτήριο *S. aureus*, σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδά τους στον ορό υγιών ατόμων.
- ❖ Τα επικυρωμένα γονίδια-στόχοι των miRNAs, σε σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται κατά τη φλεγμονώδη απόκριση έναντι των λοιμώξεων.
- ❖ Η διαφοροποίηση της έκφρασης των miRNAs σε καλλιέργειες κυττάρων υμένα, ασθενών με λοίμωξη γύρω από το εμφύτευμα, από το βακτήριο *S. aureus*, συγκριτικά με την αντίστοιχη έκφρασή τους σε κύτταρα υμένα, ατόμων χωρίς λοίμωξη.

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B.1. Υλικά και Μέθοδοι

B.1.1. Συλλογή δειγμάτων

Από τους ασθενείς με λοίμωξη γύρω από εμφύτευμα (περιπροθετική λοίμωξη) και από τους ασθενείς χωρίς περιπροθετική λοίμωξη, οι οποίοι νοσηλεύτηκαν στην Ορθοπαιδική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας και συμπεριελήφθησαν στη μελέτη, αρχικά απομονώθηκε περιφερικό αίμα, και επακόλουθα, πραγματοποιήθηκε η απομόνωση του ορού. Συγκεκριμένα, την ομάδα μελέτης αποτέλεσαν 20 ασθενείς, οι οποίοι υπεβλήθησαν σε ολική αρθροπλαστική και εμφάνισαν λοίμωξη μετά τη χρήση εμφυτευμάτων (17 γυναίκες και 3 άνδρες, με μέσο όρο ηλικίας 60 ± 6 έτη) και την ομάδα ελέγχου, αποτέλεσαν 6 ασθενείς (5 γυναίκες και 1 άνδρας, με μέσο όρο ηλικίας 58 ± 4 έτη), που υπεβλήθησαν σε ολική αρθροπλαστική και δεν εμφάνισαν λοίμωξη 5 χρόνια μετά την επέμβαση. Επίσης, από τους 20 ασθενείς με περιπροθετική λοίμωξη, καθώς και από τους 6 ασθενείς χωρίς περιπροθετική λοίμωξη, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αρθρικού υμένα, τα οποία απομονώθηκαν υπό άσηπτες συνθήκες, στο χώρο του χειρουργείου.

B.1.2. Καλλιέργειες κυττάρων υμένα

Τα δείγματα αρθρικού υμένα που ελήφθησαν άσηπτα κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης, χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση και την καλλιέργεια κυττάρων υμένα. Τα κύτταρα αυτά διατέθηκαν για περαιτέρω πειραματικούς χειρισμούς.

B.1.2.1. Απομόνωση κυττάρων υμένα

Η απομόνωση κυττάρων υμένα από δείγματα αρθρικού υμένα περιλαμβάνει ενζυμική κατεργασία των δειγμάτων, προκειμένου τα κύτταρα να απελευθερωθούν από την ECM που τα περιβάλλει, κι επακόλουθη μεταφορά των κυττάρων υμένα σε επωαστικό κλίβανο.

Για το σκοπό αυτό, τα δείγματα του αρθρικού υμένα, μετά την παραλαβή τους από το χειρουργείο υπεβλήθησαν αρχικά σε έκπλυση με το ρυθμιστικό διάλυμα PBS, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν ανεπιθύμητα υπολείμματα και να διατηρηθεί η σταθερότητα του pH τους. Στη συνέχεια, οι ιστοί του υμένα – εντός 24 ωρών από τη λήψη τους – τεμαχίστηκαν με τη βοήθεια αποστειρωμένων νυστεριών σε μικρά κομμάτια και ακολούθησε επώασή τους με τα πρωτεολυτικά ένζυμα προνάση και κολλαγενάση. Η προνάση έχει την ικανότητα να διασπά τις πρωτεογλυκάνες της ECM του ιστού, συμβάλλοντας στην απελευθέρωση των κολλαγόνων ινών, τις οποίες στη

συνέχεια διασπά η κολλαγενάση, οδηγώντας τελικά στην απελευθέρωση των κυττάρων υμένα από την ECM του υμένα. Τα κύτταρα, μετά την απομόνωσή τους τοποθετούνται σε φλάσκες και επωάζονται σε κλίβανο σε σταθερές συνθήκες, όπου τους επιτρέπεται να προσκολληθούν στην επιφάνεια της φλάσκας και να αναπτυχθούν. Τα κύτταρα υμένα, αμέσως μετά την απομόνωσή τους, αιωρούνται στο θρεπτικό υλικό και έχουν σχήμα στρογγυλό, ενώ μετά το πέρας 48 ωρών, τα κύτταρα προσκολλώνται και αποκτούν σχήμα πεπλατυσμένο και πολυγωνικό.

Για την καλλιέργεια των κυττάρων υμένα χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F-12 (DMEM/F-12, Gibco, Paisley, Scotland, UK) εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco, Paisley, Scotland, UK) και 1% αντιβιοτικά 100 U/ml πενικιλίνη και 100 mg/ml στρεπτομυκίνη (Penicillin-Streptomycin, P/S, Gibco, Paisley, Scotland, UK). Το πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM/F-12 διατηρείται στους 4 βαθμούς Κελσίου. Επιπλέον, κατά τους περαιτέρω πειραματικούς χειρισμούς των κυττάρων, χρησιμοποιήθηκαν το ρυθμιστικό διάλυμα PBS w/o Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ (Phosphate-Buffered Saline, Gibco, Paisley, Scotland, UK) και το ένζυμο θρυψίνη (Biocrom). Η θρυψίνη, πριν από κάθε χρήση της θερμαίνεται στους 37 βαθμούς Κελσίου με επώαση σε υδατόλουτρο, προκειμένου να ενεργοποιηθεί η δράση της.

Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε επωαστικό κλίβανο (Heraus Instrumanets) με σταθερή θερμοκρασία 37 βαθμών Κελσίου και ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO₂. Όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων έγιναν μέσα σε εστία κάθετης νηματικής ροής προς αποφυγή εξωτερικών μολύνσεων.

Πειραματική διαδικασία

- Τοποθέτηση του φρέσκου ιστού σε τρυβλίο Petri και προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος PBS w/o Ca²⁺, Mg²⁺ σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ξέπλυμα του ιστού 2-3 φορές με σκοπό την απομάκρυνση υπολειμμάτων του χειρουργείου και τη διατήρηση της σταθερότητας του pH.
- Τεμαχισμός του ιστού σε μικρά κομμάτια με αποστειρωμένο νυστέρι.
- Μεταφορά των τεμαχίων σε πλάκα των 6 φρεατίων και προσθήκη 2 ml πλήρους θρεπτικού υλικού.
- Προσθήκη προνάσης (Pronase, Roche, Mannheim, Germany) 5 mg/ml με 2 ml πλήρους θρεπτικού υλικού και επώαση στον κλίβανο (37°C, 5% CO₂) για 30 λεπτά.
- Αφαίρεση του υπερκείμενου με αποστειρωμένη πλαστική πιπέτα Pasteur μιας χρήσης.

- Προσθήκη κολλαγενάσης (Collagenase P, Roche, Mannheim, Germany) 5 mg/ml με 2 ml πλήρους θρεπτικού υλικού και επώαση στον κλίβανο (37°C, 5% CO₂) για 90 min (ανάδευση ανά 15 min).
- Μηχανική υποβοήθηση στην απελευθέρωση των κυττάρων υμένα από το δίκτυο των κολλαγόνων ινών με γυάλινη αποστειρωμένη πιπέτα Pasteur.
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε πλαστικό σωληνάριο των 15 ml (falcon), φυγοκέντρωση του υπερκειμένου στις 2.000 rpm για 7 min σε θερμοκρασία δωματίου, απομάκρυνση του υπερκειμένου, αναδιάλυση του ιζήματος με 2 ml θρεπτικού διαλύματος και επανάληψη της διαδικασίας άλλες δύο φορές.
- Μεταφορά των κυττάρων σε φλάσκα των 25 ml με 5 ml πλήρους θρεπτικού υλικού και επώαση στον κλίβανο (37°C, 5% CO₂)

B.1.2.2. Ανακαλλιέργεια κυττάρων υμένα

Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων γίνεται κάθε φορά που τα κύτταρα κάλυπταν το 80-90% της επιφάνειας της φλάσκας. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων υμένα γινόταν περίπου ανά 7 ημέρες, ανάλογα κάθε φορά με το μέγεθος του αρχικού ιστού και τον αριθμό των κυττάρων που απελευθερώνονταν από αυτόν.

Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων, γίνεται αρχικά έκπλυσή τους με 5 ml PBS και επακόλουθη αποκόλλησή τους από την επιφάνεια της φλάσκας με την προσθήκη 1 ml θρυψίνης, ενός ενζύμου που έχει την ικανότητα να διασπά τις συνδέσεις που αναπτύσσονται μεταξύ των κυττάρων και της επιφάνειας της φλάσκας. Μετά την επώαση των κυττάρων για 5 min (μέγιστη χρονική διάρκεια 10 min) με θρυψίνη στον κλίβανο, η αποκόλλησή τους παρατηρείται στο μικροσκόπιο κι ακολουθεί προσθήκη πλήρους θρεπτικού υλικού σε τριπλάσια τουλάχιστον ποσότητα του όγκου του ενζύμου, προκειμένου να διακοπεί η δράση του τελευταίου.

B.1.2.3. Κατάψυξη και απόψυξη κυττάρων υμένα

Τα κύτταρα υμένα που έχουν απομονωθεί από τα δείγματα του αρθρικού υμένα, έχουν αναπτυχθεί στις φλάσκες και δεν προορίζονται για άμεσους περαιτέρω πειραματικούς χειρισμούς, μπορούν να αναπτυχθούν στους -150°C και να αποψυχθούν όταν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν.

Για την κατάψυξη των κυττάρων υμένα, τα κύτταρα αποκολλώνται με την προσθήκη θρυψίνης, επαναδιαλύονται σε θρεπτικό υλικό παγώματος και τοποθετούνται σε ειδικό κρυοφιαλίδιο σε συγκέντρωση $4-5 \times 10^6$ ml. Το θρεπτικό υλικό παγώματος αποτελείται από 60% θρεπτικό υλικό, 30% ορό εμβρύου βοός και 10% διμέθυλο-σουλφοξείδιο (Dimethyl Sulfoxide, DMSO, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Το DMSO συμβάλλει στη σταδιακή ψύξη του θρεπτικού υλικού και κατά

συνέπεια, των κυττάρων, παρεμποδίζοντας το σχηματισμό κρυστάλλων που θα μπορούσαν να προκαλέσουν βλάβες στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων. Για τον ίδιο λόγο, η κατάψυξη των κυττάρων γίνεται σταδιακά και κατά συνέπεια τα κρυοφιαλίδια τοποθετούνται αρχικά στους -20°C για 4 ώρες, κατόπιν στους -80°C για 24 ώρες και τελικά στους -150°C , όπου αποθηκεύονται επ' άπειρον.

Σε αντίθεση με τη σταδιακή κατάψυξη των κυττάρων, η απόψυξή τους γίνεται ταχέως, με τη μεταφορά του κρυοφιαλιδίου από τους -150°C απευθείας στους 37°C σε υδατόλουτρο, την άμεση επαναδιάλυσή τους σε 5 ml πλήρους θρεπτικού υλικού και τη μεταφορά τους σε σωληνάριο των 15 ml. Στη συνέχεια, τα κύτταρα φυγοκεντρούνται για 5 min στις 2.000 rpm, προκειμένου να καθιζάνουν. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 7-8 ml πλήρους θρεπτικού υλικού, τα κύτταρα υμένα μεταφέρονται σε φιάσκα των 25 ml και επωάζονται στον κλίβανο.

B.1.3. Απομόνωση ορού από περιφερικό αίμα

Πειραματική διαδικασία

- Μεταφορά ολικού αίματος σε σωληνάριο που δεν περιέχει αντιπηκτικό.
- Επώαση του σωληναρίου σε κατακόρυφη θέση για 60 min.
- Φυγοκέντρωση
- Μεταφέρουμε προσεκτικά το υπερκείμενο (ορός) σε σωλήνα φυγοκέντρου.
- Έλεγχος της θολερότητας του ορού. Σε περίπτωση θολού δείγματος επαναλαμβάνουμε τα δύο προηγούμενα βήματα έτσι ώστε να αφαιρεθεί το αδιάλυτο υλικό.
- Μεταφέρουμε την ποσότητα του ορού σε κατάλληλα κρυοφιαλίδια και αποθηκεύουμε τα δείγματα στους -80°C .

B.1.4. Απομόνωση RNA

B.1.4.1. Απομόνωση RNA από τον ορό

Πειραματική διαδικασία

- Βγάζουμε από τους -80°C τους ορούς και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να ξεπαγώσουν.
- Προσθέτουμε σε σωληνάριο των 2 ml, 200 μl από κάθε δείγμα ορού.
- Προσθέτουμε σε κάθε δείγμα 1 ml QIAzol Lysis Reagent.
- Επωάζουμε για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσθέτουμε σε κάθε δείγμα 200 μl χλωροφορμίου και αναδεύουμε πολύ καλά με έντονο vortex.
- Επωάζουμε τα δείγματα για 2-3 min σε θερμοκρασία δωματίου.

- Φυγοκεντρούμε για 15 min στις 12.000 rpm σε θερμοκρασία 4°C.
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο (ανώτερη υδατική φάση) σε νέο σωληνάριο των 2 ml.
- Προσθέτουμε σε κάθε δείγμα 900 μl αιθανόλη και αναδεύουμε καλά με πιπέτα.
- Μεταφέρουμε 700 μl κάθε δείγματος σε στήλη RNeasy MinElute spin column.
- Φυγοκεντρούμε για 15 sec στις 10.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 10 και 11 μέχρι να περάσει από τη στήλη και το υπόλοιπο των δειγμάτων.
- Προσθέτουμε σε κάθε δείγμα 700 μl Buffer RWT και φυγοκεντρούμε για 15 sec στις 10.000 στροφές σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αποχύνουμε το περιεχόμενο από το collection tube και επανατοποθετούμε τη στήλη στο ίδιο tube.
- Προσθέτουμε σε κάθε δείγμα 500 μl Buffer RPE και φυγοκεντρούμε για 15 sec στις 10.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
- Αποχύνουμε το περιεχόμενο από το collection tube και επανατοποθετούμε τη στήλη στο ίδιο tube.
- Προσθέτουμε σε κάθε δείγμα 500 μl 80% αιθανόλη και φυγοκεντρούμε για 2 min στις 10.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μετά τη φυγοκέντρωση τοποθετούμε τη στήλη σε καθαρό collection tube (απορρίπτουμε το παλιό) και φυγοκεντρούμε στις μέγιστες στροφές σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min, ώστε να στεγνώσει η μεμβράνη.
- Μετά τη φυγοκέντρωση τοποθετούμε τη στήλη σε σωληνάριο των 2 ml (απορρίπτουμε το collection tube).
- Προσθέτουμε σε κάθε δείγμα 17 μl RNase-free water στο κέντρο της μεμβράνης και φυγοκεντρούμε για 1 min στις μέγιστες στροφές σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μετά τη φυγοκέντρωση πετάμε τη στήλη και αποθηκεύουμε το RNA στους -80 βαθμούς Κελσίου.

B.1.4.2. Απομόνωση RNA από καλλιέργειες κυττάρων

Από τις καλλιέργειες των κυττάρων υμένα απομονώθηκε RNA για τη διερεύνηση της έκφρασης συγκεκριμένων miRNA γονιδίων.

Πειραματική διαδικασία

- Σε κύτταρα υμένα αποκολλημένα από τη φλάσκα προστέθηκε 1 ml Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK) με στόχο τη λύση των κυττάρων.
- Τα δείγματα επωάστηκαν για 5 min στο υδατόλουτρο στους 15-30°C.

- Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 13.000 rpm για 15 min στους 4°C.
- Μετά τη φυγοκέντρηση, σε κάθε σωληνάριο υπήρχαν τρεις φάσεις: η υποκείμενη φάση που περιέχει Trizol / χλωροφόρμιο, η μεσόφαση και η ανώτερη υδατική φάση στην οποία έχει απομονωθεί το RNA.
- Η ανώτερη υδατική φάση που περιέχει το RNA, μεταφέρθηκε σε νέο σωληνάριο των 2 ml, όπου πραγματοποιήθηκε η κατακρήμνιση του RNA με προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπυλικής αλκοόλης.
- Ακολούθησε επώαση των δειγμάτων για 10 min στο υδατόλουτρο, στους 15-30°C και φυγοκέντρησή τους στις 12.000 rpm για 10 min στους 4°C.
- Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, προστέθηκαν 500 μl κρύας αιθανόλης 70% στο ίζημα και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 min στις 10.000 rpm στους 4°C.
- Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, και αφού το ίζημα στέγνωσε πολύ καλά (το σωληνάριο βρίσκεται σε πάγο με ανοιχτό καπάκι και προστατευμένο με τρυπημένη μεμβράνη) διαλυτοποιήθηκε. Η διάλυση έγινε με προσθήκη 30 μl ddH₂O.
- Ακολούθησε επώαση στο υδατόλουτρο για 10 min στους 55 – 65°C.

B.1.4.3. Φωτομέτρηση του RNA – Έλεγχος ποσότητας

Για να ελεγχθεί η ποσότητα του RNA πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση σε κάθε δείγμα. Αραιώσεις κάθε δείγματος (1:100) φωτομετρήθηκαν στα 260 και 280 nm. Υπολογίστηκε ο λόγος 260/280, καθώς και η συγκέντρωση του RNA με βάση τον τύπο: συγκέντρωση RNA = αραίωση × OD₂₆₀ × 40 (μgr/ml)

B.1.4.4. Ηλεκτροφόρηση του RNA – Έλεγχος ποιότητας

Προκειμένου να ελεγχθεί η ποιότητα του RNA, πραγματοποιήθηκε σε κάθε δείγμα ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 2%.

B.1.5. Ποσοτικοποίηση των miRNAs: miR-21, miR-16, miR-125, miR-19a, miR-19b, miR-223, miR-365 με τη μέθοδο της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time-PCR)

B.1.5.1. Ανίχνευση και ποσοτικοποίηση miRNAs στον ορό

Για την ποσοτικοποίηση των microRNAs στον ορό χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμα πλακάκια των 96 θέσεων ειδικά σχεδιασμένα για microRNAs σχετιζόμενα με τη φλεγμονή. Η τεχνολογία βασίζεται στη χρήση ειδικών ανιχνευτών,

οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί με την ώριμη αλληλουχία των microRNAs και είναι σημασμένοι με ειδικό φθοριόχρωμα που επιτρέπει την ανίχνευσή τους. Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται έχουν μέγεθος 42-46 νουκλεοτιδίων και διαθέτουν μία αλληλουχία περίπου 20 νουκλεοτιδίων, η οποία προσδένεται στην αλληλουχία του miRNA που θα μελετηθεί. Ο υβριδισμός του microRNA με τον αντίστοιχο ανιχνευτή οδηγεί στη δημιουργία δίκλωνων μορίων, τα οποία εντοπίζονται με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green. Τα πρωτόκολλα και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA) καθώς και τη διεξαγωγή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Real Time-PCR) ακολουθούσαν τις διαδικασίες του κατασκευαστή και συνάδουν με τις διαδικασίες της συμβατικής Real Time-PCR.

B.1.5.2. Ανίχνευση και ποσοτικοποίηση miRNAs σε κύτταρα αρθρικού υμένα

Τα δείγματα RNA που απομονώθηκαν από τα καλλιεργημένα κύτταρα υμένα, μετατράπηκαν σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription, RT), in vitro, χρησιμοποιώντας ως εκκινητές, ολιγονουκλεοτίδια γνωστής αλληλουχίας (stem loop RT primer, 5 pmol), (Πίνακας 1) ώστε να ενισχυθεί η περιοχή που διαθέτει το microRNA (και το U6 snRNA) που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε {miR-19a, miR-19b, miR-16, miR-21, miR-125b, miR-223 και miR-365 stem loop RT primer ή U6 small nuclear RNA (RNU6B) stem loop RT primer}. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση είναι η αντίστροφη μεταγραφάση SuperScript III (200U/μl, Life Technologies). Η σύνθεση cDNA από RNA 1,5 μl (1μgr) πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια και περιείχε τα παρακάτω αντιδραστήρια:

Στάδιο 1

Αντιδραστήρια	Ποσότητα/αντίδραση
RNA	1,5 μl
Stem loop RT primer	1 μl
ddH ₂ O	12,5 μl
	Τελικός όγκος: 15 μl

Στάδιο 2

Αντιδραστήρια	Ποσότητα/αντίδραση
5x Buffer	4 μ l
dNTPs	2 μ l
M-MLV	1 μ l
	Τελικός όγκος: 7 μ l

Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:

- Το διάλυμα RNA με τους stem loop RT primers, θερμάνθηκε στους 70°C επί 10 min για την αποδιάταξη δευτεροταγών δομών του RNA.
- Ακολούθησε επώαση στον πάγο για 5 min για τη σταθεροποίηση της αποδιάταξης δευτεροταγών δομών του RNA.
- Μετά την προσθήκη και των υπολοίπων αντιδραστηρίων, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε συσκευή PCR στις ακόλουθες συνθήκες:
 - 20°C, 10 min
 - 42°C, 45 min
 - 99°C, 3 min
 - 18°C, 5 min
 - Τελική θερμοκρασία: 4°C

Το ενδεχόμενο ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων λόγω αδυναμίας ενίσχυσης του RNA, μπορεί να αποκλεισθεί με ενίσχυση αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε μετάγραφα γονιδίων, τα οποία εκφράζονται πάντοτε στον υπό ανάλυση ιστό (μετάγραφα «αναφοράς»). Στην παρούσα μελέτη, ως μετάγραφο «αναφοράς» χρησιμοποιείται το RNA μετάγραφο του γονιδίου U6 small nuclear RNA (U6 snRNA), ένα είδος RNA που αποτελεί βασικό συστατικό του ριβονουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου U6 snRNP, το οποίο αλληλεπιδρά με άλλα snRNP σύμπλοκα, pre-mRNA αλληλουχίες και διάφορες πρωτεΐνες, σχηματίζοντας εν τέλει ένα μεγάλο, μοριακό

σύμπλοκο, αποτελούμενο από RNA και πρωτεΐνες, στο οποίο πραγματοποιείται το μάπισμα των pre-mRNA αλληλουχιών. Συνεπώς, ως μάρτυρας για την αποτελεσματικότητα της σύνθεσης του προϊόντος, το cDNA του U6 snRNA ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές για τις αλληλουχίες του (F: Forward, R: Reverse) (Πίνακας 1).

Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:

- Αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 1 min
- 35 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
- Αποδιάταξη στους 95°C για 15 sec
- Υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 56°C για 15 sec
- Επιμήκυνση στους 72°C για 10 sec
- Τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 min

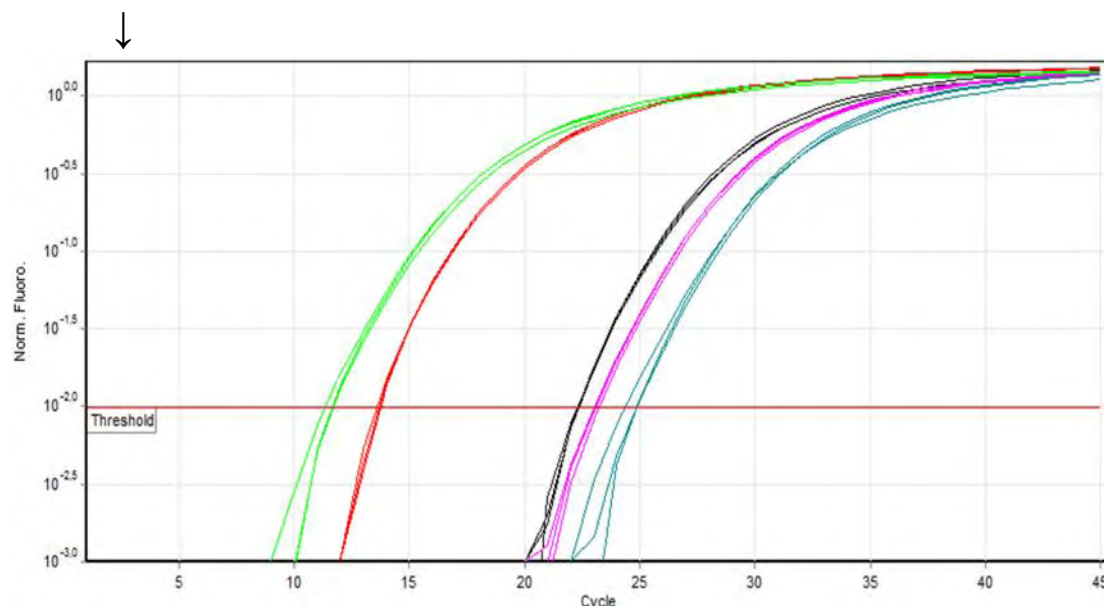
B.1.6. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (quantitative Real – time PCR, qRT – PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real time-PCR), γνωστή και ως ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR), αποτελεί μία παραλλαγή της κλασικής PCR, η οποία επιτρέπει την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση ενός συγκεκριμένου μορίου DNA. Η Real Time-PCR, βασίζεται στις γενικές αρχές της κλασικής μεθόδου PCR. Ωστόσο, το κύριο χαρακτηριστικό της είναι ότι, το μόριο DNA που ενισχύεται ποσοτικοποιείται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Η ποσοτικοποίηση, μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση φθορίζουσών χρωστικών που παρεμβάλλονται στη διπλή έλικα του DNA. Τα επίπεδα του φθορισμού, τα οποία μετρώνται από έναν ειδικό ανιχνευτή, αντανakλούν τα επίπεδα έκφρασης του υπό μελέτη γονιδίου, καθώς η χρωστική φθορίζει μόνο όταν προσδένεται σε δίκλωνο DNA. Συχνά, η Real time-PCR συνδυάζεται με την PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR), με σκοπό την ποσοτικοποίηση του mRNA ή microRNA, σε κύτταρα ή ιστούς (Εικόνα 10).

Στην παρούσα εργασία, η μέθοδος της Real time-PCR χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των μεταγράφων των εξής miRNA μορίων: miR-19a, miR-19b, miR-21, miR-125b, miR-16, miR-223 και miR-365. Για την ανίχνευση των προϊόντων της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε η συσκευή ABI 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) και η φθορίζουσα ουσία SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Η SYBR Green προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα

για την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων σε πραγματικό χρόνο, καθώς έχει τη δυνατότητα να συνδεθεί σε όλα τα δίκλινα μόρια DNA, αλλά μόνο σε μια συγκεκριμένη περιοχή κάθε φορά, αυξάνοντας την ευαισθησία της μεθόδου.

Sample RNA → Reverse transcription → cDNA → PCR amplification and detection



Εικόνα 10. Η Real – time PCR συνδυάζεται συχνά με την PCR αντίστροφης μεταγραφής για την ποσοτικοποίηση του mRNA ή microRNA σε κύτταρα ή ιστούς. Τα αποτελέσματα της Real time-PCR αναλύονται με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή.

Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε μετά από σύγκριση των μεταγράφων του εκάστοτε υπό μελέτη miRNA, με αυτά του γονιδίου αναφοράς (σχετική ποσοτικοποίηση), με τη συγκριτική μέθοδο CT (Comparative CT method). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί μαθηματικούς τύπους, όπως ο $\Delta\Delta Ct$, προκειμένου να υπολογιστεί ο σχετικός λόγος έκφρασης (R) του υπό μελέτη miRNA, βάσει της διαφοράς των κύκλων του PCR μεταξύ αυτού και του γονιδίου αναφοράς. Στην παρούσα εργασία, η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του εξής μαθηματικού τύπου:

$$R = 2^{-(\Delta Ct \text{ δείγματος} - \Delta Ct \text{ control})}$$

$$R = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$$

Κάθε δείγμα ελέγχθηκε τόσο για το υπό μελέτη miRNA, όσο και για το γονίδιο αναφοράς. Στην παρούσα μελέτη, ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το U6 snRNA. Επιπροσθέτως, για κάθε δείγμα η διαδικασία επαναλήφθηκε 2 φορές. Τα cDNA που χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις αντιδράσεις ήταν αραιωμένα 1:100. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στον Πίνακα 1.

Το διάλυμα αντίδρασης για τον ποσοτικό προσδιορισμό κάθε ενός από τα γονίδια που περιγράφονται παρακάτω, περιείχε τα εξής αντιδραστήρια:

cDNA	2 μ l
SYBR Green	5 μ l
Εκκινητής Forward	0,3 μ l
Εκκινητής Reverse	0,3 μ l
ddH ₂ O	2,4 μ l

Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:

- Αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 10 min
- 45 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
 - Αποδιάταξη στους 95°C για 30 sec
 - Υβριδοποίηση των εκκινητών στη θερμοκρασία του σημείου τήξεως (melting temperature, T_m) του κάθε εκκινητή για 30 sec
 - Επιμήκυνση στους 72°C για 15 sec
- Τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 min

Πίνακας 1. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μετατροπή του RNA σε cDNA (Stem loop RT Primers) και για τη μελέτη των σχετικών επιπέδων έκφρασης των επιλεγμένων miRNAs με τη μέθοδο της Real Time-PCR (Forward, Reverse).

Κατηγορία αλληλουχίας εκκινητών	Αλληλουχία εκκινητών
U6 Stem loop	5'CACGGAAGCCCTCACACCGTGTCTGTT C3'
U6 Forward	5'GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT3'
U6 Reverse	5'CTCACACCGTGTCTGTTCCA3'
miR-21 Stem loop	5'GTCGTATCCAGTGCCTGTCTGTTGGAGT CGGCAATTGCACTGGATACGACACAGC CCA 3'
miR-21 Forward	5'GCGGCAACACCAGTCGATG3'
miR-21 Reverse	5'TGCGTGTCTGTTGGAGTC3'
miR-16 Stem loop	5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGACCGCCAAT3'
miR-16 Forward	5'CGCGCTAGCAGCACGTA3'
miR-16 Reverse	5'GTGCAGGGTCCGAGGT3'
miR-125 Stem loop	5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGACTCACAA3'
miR-125 Forward	5'ACCCCTCCCTGAGACCCCTAAC3'
miR-125 Reverse	5'GTGCAGGGTCCGAGGT3'
miR-19a Stem loop	5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGACTCAGTTT3'

miR-19a Forward	5'CTGGAGTGTGCAAATCTATGC3'
miR-19a Reverse	5'GTGCAGGGTCCGAGGT3'
miR-19b Stem loop	5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGACTCAGTT3'
miR-19b Forward	5'TCCTGTGCAAATCTATGCAAAAC3'
miR-19b Reverse	5'GTGCAGGGTCCGAGGT3'
miR-223 Stem loop	5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGACTGGGGT3'
miR-223 Forward	5'CGTTGTCAGTTTGTCAAATAC3'
miR-223 Reverse	5'CAGTGCAGGGTCCGAGGT3'
miR-365 Stem loop	5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGACATAAGG3'
miR-365 Forward	5'CGTAATGCCCTAAAAAT3'
miR-365 Reverse	5'GTGCAGGGTCCGAGGT3'

B.1.7. Βιοπληροφορική ανάλυση

Προκειμένου να προσδιοριστεί η βιολογική σημασία των επικυρωμένων γονιδίων-στόχων των miRNAs, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των μονοπατιών με τη χρήση του διαδικτυακού υπολογιστικού εργαλείου DIANA-mirPath (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/pathways/>) και της βάσης δεδομένων Tarbase. Το συγκεκριμένο λογισμικό αναλύει πολλαπλούς γονιδιακούς στόχους των miRNAs, συγκρίνοντας κάθε ομάδα γονιδίων-στόχων των miRNAs με όλα τα γνωστά KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) σηματοδοτικά μονοπάτια. (Kanehisa M, 2000)

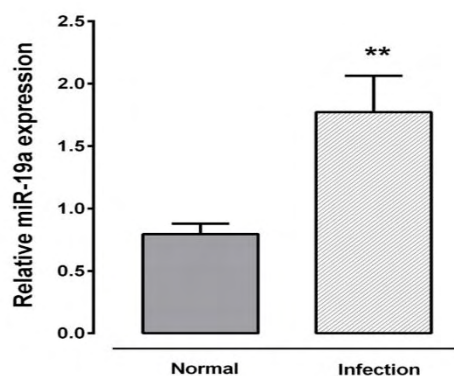
B.1.8. Στατιστική Ανάλυση

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα στατιστικής επεξεργασίας GraphPad έκδοση 4 (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). Για τη στατιστική ανάλυση όλων των πειραματικών δεδομένων μεταξύ δύο ομάδων, χρησιμοποιήθηκαν οι διαδικασίες Independent-samples T-test και Mann-Whitney 2-tailed U test. Τα αποτελέσματα των πειραματικών δεδομένων παρουσιάζονται ως μέσες τιμές με το τυπικό σφάλμα (mean \pm standard error of the mean, SEM). Σε όλες τις περιπτώσεις ως όριο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε η τιμή $p < 0.05$.

B.2. Αποτελέσματα

B.2.1. Μελέτη της σχετικής έκφρασης του miR-19a σε καλλιέργειες φυσιολογικών κυττάρων αρθρικού υμένα και κυττάρων αρθρικού υμένα ασθενών με λοίμωξη από το στέλεχος *Staphylococcus aureus*

Στη σειρά των πειραμάτων που διεξήχθησαν στην παρούσα εργασία αξιολογήθηκε η σχετική έκφραση του miR-19a, σε κύτταρα καλλιέργειας αρθρικού υμένα υγιών ατόμων, καθώς και σε κύτταρα καλλιέργειας αρθρικού υμένα ασθενών.

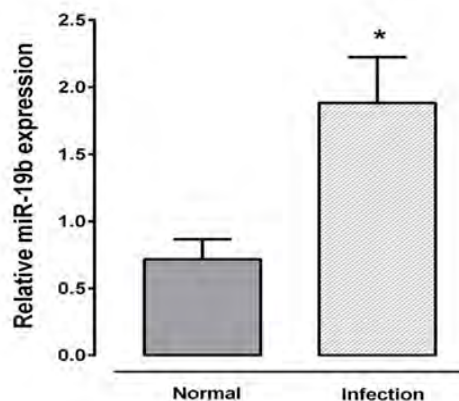


Εικόνα 11. Τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του miR-19a (mann-whitney, $p=0,01$) σε κύτταρα αρθρικού υμένα υγιών ατόμων και σε κύτταρα αρθρικού υμένα ασθενών με λοίμωξη, ομαλοποιημένα ως προς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς U6 snRNA.

Η μελέτη της σχετικής έκφρασης του miR-19a με τη μέθοδο της qRT-PCR, έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασής του στα κύτταρα αρθρικού υμένα ασθενών με λοίμωξη, σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασής του στα κύτταρα αρθρικού υμένα υγιών ατόμων ($p = 0,01$) (Εικόνα 11).

B.2.2. Μελέτη της σχετικής έκφρασης του miR-19b σε καλλιέργειες φυσιολογικών κυττάρων αρθρικού υμένα και κυττάρων αρθρικού υμένα ασθενών με λοίμωξη από το στέλεχος *Staphylococcus aureus*

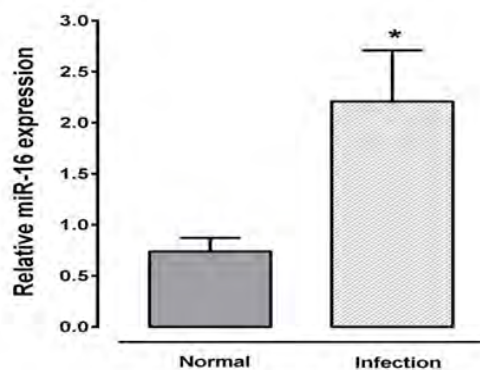
Αξιολογήθηκε η σχετική έκφραση του miR-19b σε κύτταρα καλλιέργειας αρθρικού υμένα υγιών ατόμων, καθώς και σε κύτταρα καλλιέργειας αρθρικού υμένα ασθενών. Η μελέτη της έκφρασης miR-19b με τη μέθοδο της qRT-PCR, έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασής του στα κύτταρα αρθρικού υμένα ασθενών με λοίμωξη, σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασής του στα κύτταρα αρθρικού υμένα υγιών ατόμων ($p = 0,04$) (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του miR-19b (unpaired t-test, $p=0,04$) σε κύτταρα αρθρικού υμένα υγιών ατόμων και σε κύτταρα αρθρικού υμένα ασθενών με λοίμωξη, ομαλοποιημένα ως προς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς U6 snRNA.

B.2.3. Μελέτη της σχετικής έκφρασης του miR-16 σε καλλιέργειες φυσιολογικών κυττάρων αρθρικού υμένα και κυττάρων αρθρικού υμένα ασθενών με λοίμωξη από το στέλεχος *Staphylococcus aureus*

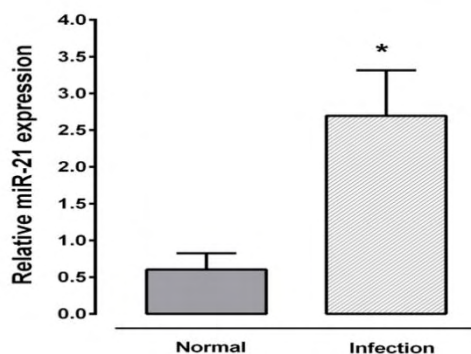
Πραγματοποιήθηκε η εκτίμηση της σχετικής έκφρασης του miR-16 σε κύτταρα καλλιέργειας αρθρικού υμένα υγιών ατόμων, καθώς και σε κύτταρα καλλιέργειας αρθρικού υμένα ασθενών. Η μελέτη του miR-16 με τη μέθοδο της qRT-PCR, έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασής του στα κύτταρα αρθρικού υμένα ασθενών με λοίμωξη, σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασής του στα κύτταρα αρθρικού υμένα υγιών ατόμων ($p = 0,04$) (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του miR-16 (mann-whitney, $p=0,04$), σε κύτταρα αρθρικού υμένα υγιών ατόμων και σε κύτταρα αρθρικού υμένα ασθενών με λοίμωξη, ομαλοποιημένα ως προς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς U6 snRNA.

B.2.4. Μελέτη της σχετικής έκφρασης του miR-21 σε καλλιέργειες φυσιολογικών κυττάρων αρθρικού υμένα και κυττάρων αρθρικού υμένα ασθενών με λοίμωξη από το στέλεχος *Staphylococcus aureus*

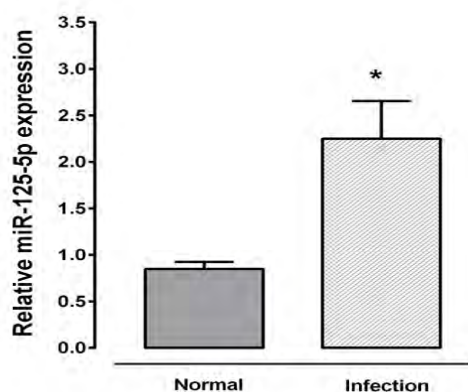
Διεξήχθη η μέτρηση της σχετικής έκφρασης του miR-21, σε κύτταρα καλλιέργειας αρθρικού υμένα υγιών ατόμων, καθώς και σε κύτταρα καλλιέργειας αρθρικού υμένα ασθενών. Η μελέτη, η οποία διεκπεραιώθηκε με τη μέθοδο της qRT-PCR, έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασής του στα κύτταρα αρθρικού υμένα ασθενών με λοίμωξη, σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασής του στα κύτταρα αρθρικού υμένα υγιών ατόμων ($p = 0,02$) (Εικόνα 14).



Εικόνα 14. Τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του miR-21 (unpaired t-test, $p=0,02$), σε κύτταρα αρθρικού υμένα υγιών ατόμων και σε κύτταρα αρθρικού υμένα ασθενών με λοίμωξη, ομαλοποιημένα ως προς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς U6 snRNA.

B.2.5. Μελέτη της σχετικής έκφρασης του miR-125b σε καλλιέργειες φυσιολογικών κυττάρων αρθρικού υμένα και κυττάρων αρθρικού υμένα ασθενών με λοίμωξη από το στέλεχος *Staphylococcus aureus*

Στην προκειμένη περίπτωση μετρήθηκε η σχετική έκφραση του miR-125b σε κύτταρα καλλιέργειας αρθρικού υμένα υγιών ατόμων, καθώς και σε κύτταρα καλλιέργειας αρθρικού υμένα ασθενών.

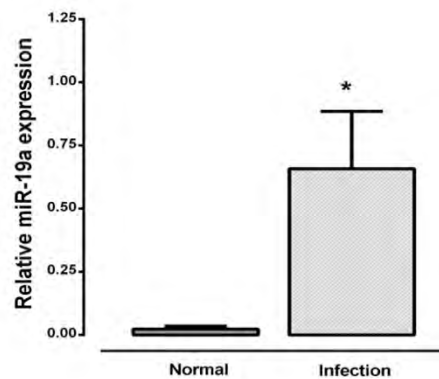


Εικόνα 15. Τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του miR-125b (unpaired t-test, $p=0,024$), σε κύτταρα αρθρικού υμένα υγιών ατόμων και σε κύτταρα αρθρικού υμένα ασθενών με λοίμωξη, ομαλοποιημένα ως προς τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αναφοράς U6 snRNA.

Η μελέτη, η οποία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της μεθόδου qRT-PCR, έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασής του στα κύτταρα αρθρικού υμένα ασθενών με λοίμωξη, σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασής του στα κύτταρα αρθρικού υμένα υγιών ατόμων ($p = 0,024$) (Εικόνα 15).

B.2.6. Μελέτη της σχετικής έκφρασης του miR-19a, σε ορό υγιών ατόμων και σε ορό ασθενών με λοίμωξη από το στέλεχος *Staphylococcus aureus*

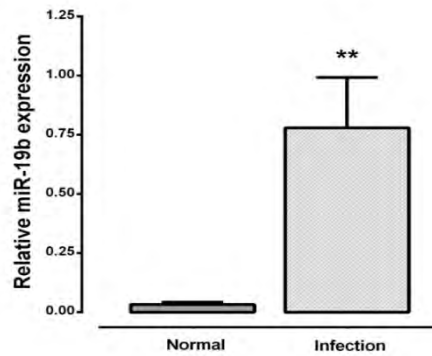
Στη σειρά των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν για το συγκεκριμένο τμήμα της παρούσας εργασίας, διερευνήθηκε η σχετική έκφραση του miR-19a, σε ορό υγιών ατόμων, καθώς και σε ορό ασθενών με λοίμωξη. Η μελέτη διεκπεραιώθηκε με τη χρήση της μεθόδου qRT-PCR, η οποία έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασής του, στον ορό ασθενών με λοίμωξη, σε σύγκριση με την αντίστοιχη στον ορό υγιών ατόμων ($p = 0,02$) (Εικόνα 16).



Εικόνα 16. Τα αυξημένα επίπεδα του miR-19a (mann-whitney, $p=0,02$) στον ορό υγιών ατόμων και στον ορό ασθενών με λοίμωξη

B.2.7. Μελέτη της σχετικής έκφρασης του miR-19b, σε ορό υγιών ατόμων και σε ορό ασθενών με λοίμωξη από το στέλεχος *Staphylococcus aureus*

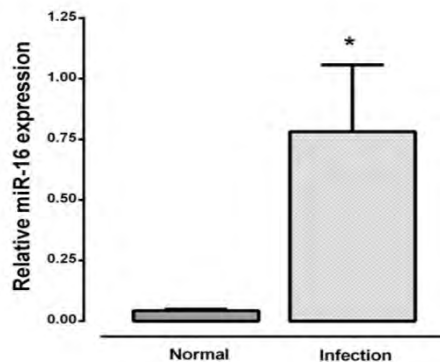
Πραγματοποιήθηκε η σχετική έκφραση του miR-19b, σε ορό υγιών ατόμων, καθώς και σε ορό ασθενών με λοίμωξη. Η μελέτη έγινε με τη χρήση της μεθόδου qRT-PCR και έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασής του στον ορό ασθενών με λοίμωξη, σε σύγκριση με την αντίστοιχη στον ορό υγιών ατόμων ($p = 0,01$) (Εικόνα 17).



Εικόνα 17. Τα αυξημένα επίπεδα του miR-19b (unpaired t-test, $p=0,01$), στον ορό υγιών ατόμων και στον ορό ασθενών με λοίμωξη

B.2.8. Μελέτη της σχετικής έκφρασης του miR-16, σε ορό υγιών ατόμων και σε ορό ασθενών με λοίμωξη από το στέλεχος *Staphylococcus aureus*

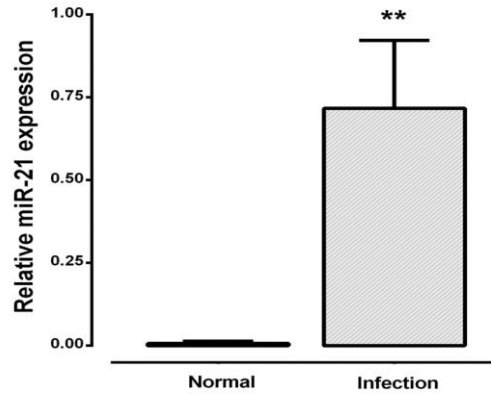
Στην προκειμένη περίπτωση, εκτιμήθηκε η σχετική έκφραση του miR-16, σε ορό υγιών ατόμων, καθώς και σε ορό ασθενών με λοίμωξη. Η μελέτη έγινε με τη χρήση της μεθόδου qRT-PCR και έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασής του στον ορό ασθενών με λοίμωξη, σε σύγκριση με την αντίστοιχη στον ορό υγιών ατόμων ($p = 0,0238$) (Εικόνα 18).



Εικόνα 18. Τα αυξημένα επίπεδα του miR-16 (mann-whitney, $p=0,0238$), στον ορό υγιών ατόμων και στον ορό ασθενών με λοίμωξη

B.2.9. Μελέτη της σχετικής έκφρασης του miR-21, σε ορό υγιών ατόμων και σε ορό ασθενών με λοίμωξη από το στέλεχος *Staphylococcus aureus*

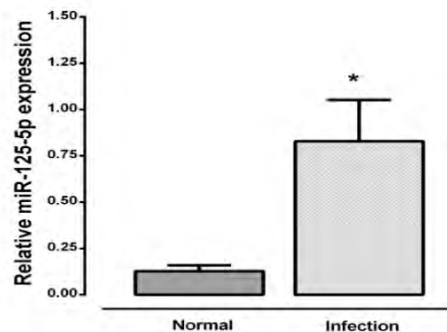
Στο συγκεκριμένο τμήμα της πειραματικής διαδικασίας, διερευνήθηκε η σχετική έκφραση του miR-21, σε ορό υγιών ατόμων, καθώς και σε ορό ασθενών με λοίμωξη. Η μελέτη έγινε με τη χρήση της μεθόδου qRT-PCR και έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασής του στον ορό ασθενών με λοίμωξη, σε σύγκριση με την αντίστοιχη στον ορό υγιών ατόμων ($p = 0,01$) (Εικόνα 19).



Εικόνα 19. Τα αυξημένα επίπεδα του miR-21 (unpaired t-test, $p=0,01$), στον ορό υγιών ατόμων και στον ορό ασθενών με λοίμωξη

B.2.10. Μελέτη της σχετικής έκφρασης του miR-125b, σε ορό υγιών ατόμων και σε ορό ασθενών με λοίμωξη από το στέλεχος *Staphylococcus aureus*

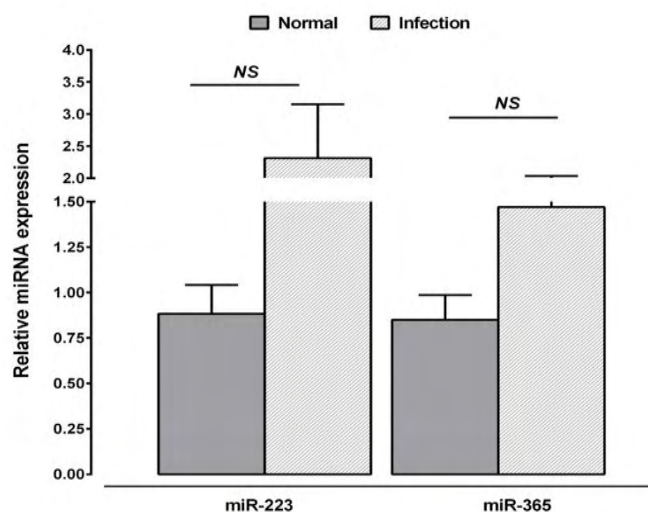
Στην παρούσα περίπτωση, αξιολογήθηκε η σχετική έκφραση του miR-125b, σε ορό υγιών ατόμων, καθώς και σε ορό ασθενών με λοίμωξη. Η μελέτη έγινε με τη χρήση της μεθόδου qRT-PCR και έδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασής του στον ορό ασθενών με λοίμωξη, σε σύγκριση με την αντίστοιχη παρουσία του στον ορό υγιών ατόμων ($p = 0,03$) (Εικόνα 20).



Εικόνα 20. Τα αυξημένα επίπεδα του miR-125b (unpaired t-test, $p=0,03$), στον ορό υγιών ατόμων και στον ορό ασθενών με λοίμωξη

B.2.11. Μελέτη της σχετικής έκφρασης των miR-223 και miR-365, σε ορό υγιών ατόμων και σε ορό ασθενών με λοίμωξη από το στέλεχος *Staphylococcus aureus*

Αξιολογήθηκε η σχετική έκφραση των miR-365 και miR-223, σε ορό υγιών ατόμων, καθώς και σε ορό ασθενών με λοίμωξη. Η μελέτη έγινε με τη χρήση της μεθόδου qRT-PCR και έδειξε μη στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασής τους στον ορό ασθενών με λοίμωξη, σε σύγκριση με την αντίστοιχη στον ορό υγιών ατόμων ($p > 0,05$) (Εικόνα 21).



Εικόνα 21. Τα αυξημένα επίπεδα των miR-223 και miR-365 (unpaired t-test, $p > 0,05$), στον ορό υγιών ατόμων και στον ορό ασθενών με λοίμωξη

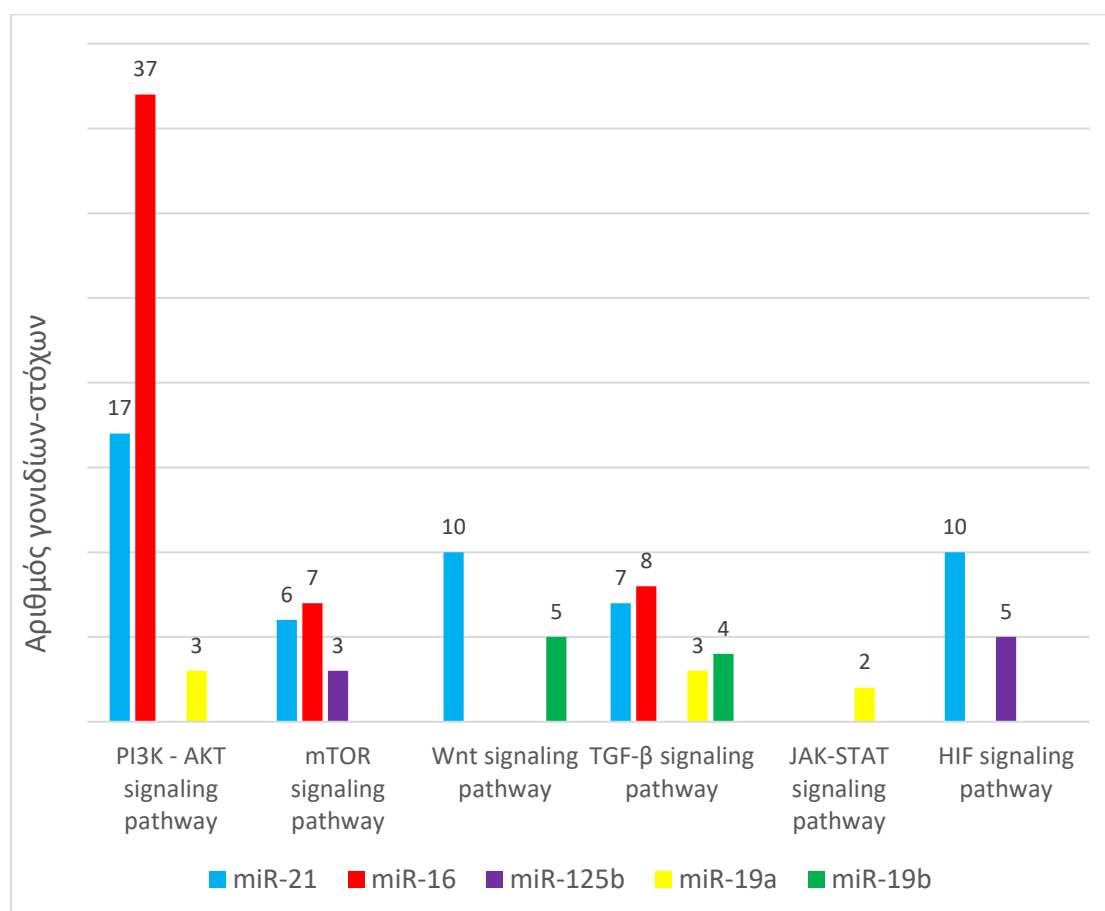
B.2.12. Βιοπληροφορική ανάλυση

Τα γονίδια, τα οποία επαληθεύτηκαν πειραματικά ως στόχοι των miRNAs που παρουσίασαν διαφοροποιημένη έκφραση στον ορό και στα κύτταρα υμένα ασθενών με περιπρωθετική λοίμωξη από το *S. aureus*, συγκριτικά με τα αντίστοιχα εκφραστικά τους επίπεδα στον ορό και στα κύτταρα υμένα φυσιολογικών ατόμων, αναλύθηκαν με τη χρήση του διαδικτυακού εργαλείου βιοπληροφορικής ανάλυσης DIANA-miRPath και της βάσης δεδομένων Tarbase. Διαπιστώθηκε εμπλουτισμός των γονιδίων-στόχων, για κάθε miRNA, σε σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με τη φλεγμονώδη απόκριση, τα οποία παρατίθενται παρακάτω:

- ❖ Σηματοδοτικό μονοπάτι Jak-Stat: Εμπλέκεται στη φλεγμονή μέσω της διαμεσολαβητικής του λειτουργίας στην κυτταρική σηματοδότηση των κυτοκινών. (John J. O'Shea, 2008)
- ❖ Σηματοδοτικό μονοπάτι TGF-β: Ενέχεται στις φλεγμονώδεις διεργασίες με τη μεσολάβησή του στη διαφοροποίηση των T κυττάρων και στον έλεγχο της ενεργοποίησης των κυττάρων της έμφυτης ανοσίας. (Shomyseh Sanjabi, 2009)
- ❖ Σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt: Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην έκφραση ποικίλων φλεγμονωδών μορίων κατά τις βακτηριακές λοιμώξεις. (Octavio Silva-García, 2014)
- ❖ Σηματοδοτικό μονοπάτι PI3k-Akt: Κατέχει κεντρικό ρόλο στην κινητοποίηση των κυττάρων της φλεγμονής, στην έκφραση και στην ενεργοποίηση φλεγμονωδών μεσολαβητών και στις αντιγονικές αλληλεπιδράσεις των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. (Anne Fougerat, 2009)
- ❖ Σηματοδοτικό μονοπάτι mTOR: Εμπλέκεται στην αναδιαμόρφωση του κυτταρικού μεταβολισμού, την απόκριση των κυτοκινών, την παρουσίαση των αντιγόνων, τη διαφοροποίηση των μακροφάγων και την κυτταρική μετανάστευση. Επίσης, θεωρείται ως ένας ενοποιητικός παράγοντας, ο οποίος συνδέει την ενεργοποίηση των κυττάρων με το περιβαλλοντικό και ενδοκυτταρικό προφίλ θρεπτικών συστατικών, ούτως ώστε να βελτιστοποιηθεί η φλεγμονώδης απόκριση. (Thomas Weichhart, 2015)

- ❖ Σηματοδοτικό μονοπάτι HIF: Η λειτουργία του εντοπίζεται στην επαγωγή ενός αριθμού πτυχών της απόκρισης του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως η προώθηση της μικροβιοκτόνου ικανότητας των φαγοκυττάρων, η καθοδήγηση της διαφοροποίησης των Τ κυττάρων και της κυτταροτοξικής δράσης τους. (Asis Palazon, 2014)

Η Εικόνα 22 αναπαριστά τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης μέσω της χρήσης του DIANA-miRPath και της βάσης δεδομένων Tarbase και δείχνει τον αριθμό γονιδίων-στόχων του κάθε miRNA στο αντίστοιχο σηματοδοτικό μονοπάτι της φλεγμονής. Ο Πίνακας 2 παρουσιάζει αναλυτικά τα γονίδια που εμπλέκονται σε κάθε σηματοδοτικό μονοπάτι της φλεγμονής, καθώς και ποια miRNAs καταστέλλουν την έκφρασή τους.



Εικόνα 22. Η βιοπληροφορική ανάλυση μέσω της χρήσης του DIANA-miRPath δείχνει τον αριθμό των γονιδίων-στόχων του κάθε miRNA στο αντίστοιχο σηματοδοτικό μονοπάτι της φλεγμονής.

Πίνακας 2. Αναλυτική παρουσίαση των εμπλεκόμενων γονιδίων στα σηματοδοτικά μονοπάτια της φλεγμονής και των miRNAs που καταστέλλουν την έκφρασή τους.

KEGG Pathway	PI3k-Akt	mTOR	Wnt	TGB-β	Jak-Stat	HIF	
Target genes	TSC1	TSC1	TCF4	TGFBR1		STAT3	miR-21
	ITGB8	PIK3R1	APC	THBS1		ERBB2	
	THBS1	RPS6KA3	WNT1	ZFYVE16		BCL2	
	BCL2	VEGFA	WNT5A	MYC		EGFR	
	EGFR	PTEN	NFAT5	TGFB2		TLR4	
	TLR4	RRAGC	CSNK1A1	TGFB2		PDHA2	
	CDK6		MYC	BMP2		PIK3R1	
	PTK2		PRICKLE2			PFKFB2	
	BRCA1		DAAM1			MKNK2	
	MYC		TBL1XR1			VEGFA	
	PIK3R1						
	PDGFD						
	VEGFA						
	PTEN						
	SGK3						
	COL5A2						
	GNB4						
KEGG Pathway	PI3k-Akt	mTOR	Wnt	TGB-β	Jak-Stat	HIF	
Target genes	YWHAH	RPS6		SMURF2			miR-16
	MYB	EIF4E		PPP2R1A			
	LAMB1	EIF4B		SMAD5			
	LAMB3	RPS6KA3		ACVR2A			
	CDC37	MTOR		SP1			
	MCL1	VEGFA		SMAD7			
	CDK2	RPS6KB1		SMAD1			
	CCND2			RPS6KB1			
	PCK2						
	HSP90AA1						
	CHUK						
	ITGB4						
	BCL2						
	EGFR						
	GNB1						
	PPP2R5C						
	RPS6						
	CDK6						
	BRCA1						
	THM4						
	CCND1						
	EIF4E						
	CCNE2						
	PPP2R1A						

	EIF4B						
	ITGA2						
	HSP90B1						
	EPHA2						
	FGF2						
	LAMC1						
	CCNE1						
	MTOR						
	VEGFA						
	SGK3						
	GRB2						
	CCND3						
	RPS6KB1						
KEGG Pathway	PI3k-Akt	mTOR	Wnt	TGB- β	Jak- Stat	HIF	
Target genes		EIF4EBP1				STAT3	miR-125
		AKT1				ERBB2	
		ULK3				EIF4EBP1	
						AKT1	
						MKNK2	
	CCND1			SMAD4	CCND1		miR-19a
	PTEN			TGFBR2	SOCS1		
	BCL2L11			BMPR2			
			DAAM2	ACVR1			miR-19b
			TCF4	SMAD4			
			CCND2	TGFBR2			
			SMAD4	BMPR2			
			PRKACB				

B.3. Συζήτηση

Οι λοιμώξεις του μυοσκελετικού συστήματος είναι σπάνιες παθολογικές καταστάσεις, οι οποίες συνδέονται με σημαντική θνησιμότητα και νοσηρότητα. Η σηπτική αρθρίτιδα αποτελεί μία από τις κυριότερες λοιμώξεις αυτής της κατηγορίας και αποτελεί μία φλεγμονώδη ασθένεια των αρθρώσεων που προκαλείται από την εισβολή ενός μολυσματικού παθογόνου παράγοντα στην περιοχή του αρθρικού ιστού. Ο συνηθέστερος παθογόνος μικροοργανισμός σε περιστατικά σηπτικής αρθρίτιδας, τόσο σε ενήλικες, όσο και σε παιδιά, είναι το βακτήριο *Staphylococcus aureus*. (Clerc O, 2011; Howard-Jones AR, 2013) Τυπικά, η σηπτική αρθρίτιδα εμπλέκει μία μεγάλη άρθρωση, όπως το γόνατο ή το ισχίο, αλλά είναι σε θέση να επηρεάσει οποιονδήποτε τύπο άρθρωσης. (P. Colavite, 2014) Η γενική εκτιμώμενη επίπτωση της ασθένειας σε βιομηχανοποιημένες χώρες, είναι περίπου έξι (6) περιστατικά ανά εκατό χιλιάδες (100,000) άτομα, κάθε χρόνο, με τα υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης να εντοπίζονται στις ηλικιακές ομάδες κάτω των δεκαπέντε (15) και άνω των πενήντα πέντε (55) ετών. (Nade S, 2003) Οι σημαντικότεροι παράγοντες κινδύνου για την εκδήλωση της σηπτικής αρθρίτιδας είναι οι προϋπάρχουσες παθολογικές καταστάσεις των αρθρώσεων και ιδιαίτερα η παρουσία ρευματοειδούς αρθρίτιδας και οι χειρουργικές επεμβάσεις εμφύτευσης προσθετικών αρθρώσεων. (P. Colavite, 2014) Επίσης, εξέχουσας σημασίας στην παθολογία της σηπτικής αρθρίτιδας θεωρούνται και οι λοιμογόνοι παράγοντες του παθογόνου μικροοργανισμού. (P. Colavite, 2014) Οι προσθετικές αρθρώσεις αποτελούν μια ιδιαίτερη περίπτωση πρόκλησης λοίμωξης των αρθρώσεων, δεδομένου ότι, παρέχουν ένα φυσιολογικό χώρο εγκατάστασης των μικροοργανισμών και ως εκ τούτου, ενδέχεται να αποτελέσουν μία δυνητική περιοχή μόλυνσης. (Miriam Garcia-Arias, 2011) Ωστόσο, μέχρι σήμερα, δεν υπάρχει ένα πλήρως αξιόπιστο σύνολο διαγνωστικών κριτηρίων για τη σηπτική αρθρίτιδα και τις λοιμώξεις των περιπροθετικών αρθρώσεων. Συνεπώς, αποτελεί επιτακτική ανάγκη η εύρεση νέων βιοδεικτών, με αποτελεσματική προγνωστική ικανότητα των αρθρικών λοιμώξεων από το *S. aureus*.

Πλέον, είναι ξεκάθαρο το γεγονός ότι, τα miRNAs διαδραματίζουν σημαντική λειτουργία στις περιπτώσεις μικροβιακών λοιμώξεων. (Eulalio A, 2012; Staedel C, 2013; Cullen B.R., 2011) Αποτελούν μονόκλωνα RNA μόρια, μήκους δεκαοχτώ έως εικοσιτεσσάρων νουκλεοτιδίων, τα οποία καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, είτε με απευθείας καταστολή της μετάφρασης του mRNA, είτε με αποσταθεροποίηση της δομής του. (D.P. Bartel, 2009) Οι υποδοχείς Toll-like αποτελούν την καλύτερα μελετημένη ομάδα υποδοχέων των οποίων η λειτουργία είναι η ταχύτατη αναγνώριση των παθογόνων μικροοργανισμών. Μετά την πρόσδεσή τους

με τα μοριακά συστατικά των παθογόνων, οι TLRs πυροδοτούν προ-φλεγμονώδεις και αντι-μικροβιακές αποκρίσεις, διαδραματίζοντας έτσι κεντρικό ρόλο στην πρώτη γραμμή άμυνας έναντι των λοιμωδών ασθενειών. Πρόσφατες έρευνες, έχουν δείξει ότι, τα miRNAs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των σηματοδοτικών μονοπατιών που επάγονται από την ενεργοποίηση των TLRs, λειτουργώντας, κατ' αυτόν τον τρόπο, ως ρυθμιστικά μόρια του πολύπλοκου δικτύου του ανοσοποιητικού συστήματος. (Xiaobing He, 2014) Συνεπώς, μέχρι σήμερα, έχει πραγματοποιηθεί ένας αριθμός ερευνητικών εργασιών, προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος των ενδοκυτταρικών miRNAs σε ασθενείς με λοίμωξη από κάποιο παθογόνο παράγοντα και ειδικότερα, η ρυθμιστική επίδραση των miRNAs στην εξέλιξη της λοίμωξης. Παρ' όλο ότι, η πλειοψηφία των miRNAs εντοπίζεται σε ενδοκυτταρικό επίπεδο, έχει παρατηρηθεί ένας σημαντικός αριθμός διαφόρων τύπων miRNAs και στο εξωκυττάριο περιβάλλον. (Alton Etheridge, 2011) Πρόσφατα, αποδείχτηκε ότι, τα miRNAs απελευθερώνονται στην κυκλοφορία από διάφορα όργανα ή ιστούς, είτε εγκλεισμένα στο εσωτερικό μικροκυστιδίων, είτε προσδεδεμένα σε εξειδικευμένες πρωτεΐνες. (Shuangli Mi, 2013) Θεωρείται ότι, τα εξωκυτάρια miRNAs διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων, *in vivo*, καθώς μπορούν να προσληφθούν από άλλα κύτταρα, διαμεσολαβώντας, έτσι, στη διακυτταρική επικοινωνία. (Rayner KJ, 2013) Τα εξωκυτάρια miRNAs διαθέτουν πολλά από τα προαπαιτούμενα χαρακτηριστικά ενός ιδανικού βιοδείκτη. (Alton Etheridge, 2011) Επιπλέον, το ιδιοσυστατικό προφίλ των εκκρινόμενων αυτών miRNAs, ενδέχεται να μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια διαφόρων παθολογικών καταστάσεων αυτών των οργάνων ή ιστών. Το 2008, η επιστημονική ομάδα του Lawrie και των συνεργατών του, εισήγαγε, για πρώτη φορά, την ιδέα ότι, τα εξωκυτάρια miRNAs θα μπορούσαν να αποτελέσουν δυνητικούς βιοδείκτες ασθενειών. (Lawrie CH, 2008) Κατά συνέπεια, έκτοτε, έχει διεξαχθεί ένας αριθμός ερευνητικών μελετών προσδιορισμού των εκφραστικών επιπέδων διαφόρων εξωκυττάρια miRNAs, σε περιπτώσεις ασθενών με λοίμωξη, υποστηρίζοντας, κατ' αυτόν τον τρόπο, τη δυνητική εφαρμογή των μορίων αυτών ως βιοδείκτες μικροβιακών λοιμώξεων.

Στη συγκεκριμένη ερευνητική μελέτη, προκειμένου να εκτιμήσουμε την πιθανότητα τα εξωκυτάρια miRNAs να αποτελέσουν βιοδείκτες λοιμώξεων του *S. aureus*, επιλέξαμε να μελετήσουμε τα επίπεδα έκφρασης των miR-21, miR-16, miR-125b, miR-19a, miR-19b, miR-223 και miR-365 στον ορό ασθενών με περιπροθετική λοίμωξη από το *S. aureus*, και στη συνέχεια να τα συγκρίνουμε με τα αντίστοιχα εκφραστικά τους επίπεδα στον ορό υγιών ατόμων. Στη συνέχεια, επιβεβαιώσαμε την εκφραστική τους διαταραχή και στα κύτταρα υμένα, ασθενών με περιπροθετική λοίμωξη από το *S. aureus*, σε σύγκριση με αυτή που παρατηρείται στα αντίστοιχα

κύτταρα, ατόμων χωρίς λοίμωξη. Η επιλογή των miRNAs βασίστηκε στη βιβλιογραφική έρευνα και συγκεκριμένα στην εύρεση ερευνητικών μελετών, οι οποίες συνδέουν τα διαφοροποιημένα εκφραστικά τους επίπεδα στους φλεγμονώδεις, παθολογικούς ιστούς με λοίμωξη, με τη ρυθμιστική τους δράση στην εξέλιξη της λοίμωξης, και μελετών, οι οποίες συσχετίζουν τη διαταραχή της έκφρασής τους στον ορό ατόμων με λοίμωξη, με την πιθανότητα να αποτελέσουν βιοδείκτες αυτών των λοιμώξεων. Εφαρμόζοντας βιοπληροφορικές αναλύσεις, ενισχύσαμε την πιθανότητα τα επιλεγμένα miRNAs να ενέχονται στη ρύθμιση της εξέλιξης μικροβιακών λοιμώξεων, δεδομένου ότι, διερευνήσαμε και ανακαλύψαμε γονίδια-στόχους τους, τα οποία εμπλέκονται σε αντιπροσωπευτικά σηματοδοτικά μονοπάτια της φλεγμονής.

Πιο αναλυτικά, η επιστημονική ομάδα του Y. Chen και των συνεργατών του, απέδειξε την αυξημένη ενδοκυτταρική έκφραση του miR-21 σε ασθενείς με λοίμωξη από τον ιό HCV, καθώς και ότι, η εκφραστική του αύξηση είχε ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της έκφρασης των IFNs-I και επακόλουθα, την καταστολή της αντι-ϊικής απόκρισης (Yanni Chen, 2013) Στον ορό, η ομάδα της της V. Bihrer και των συνεργατών της, έδειξε ότι, στην περίπτωση φλεγμονώδους ηπατικής ασθένειας λόγω χρόνιας λοίμωξης με τον HCV, τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του miR-21 στον ορό των ασθενών, θα μπορούσαν να αποβούν χρήσιμη παράμετρος για τη διάκριση των ατόμων με ελάχιστη νεκρωτική ηπατική φλεγμονή, από αυτούς με μέτρια και ισχυρή. (Verena Bihrer, 2011) Στη δική μας ερευνητική μελέτη, τα αποτελέσματα έδειξαν αύξηση της έκφρασης του miR-21 στα κύτταρα υμένα, ασθενών με περιπρωθετική λοίμωξη από το *S. aureus*, συγκριτικά με τα αντίστοιχα εκφραστικά του επίπεδα στα κύτταρα υμένα υγιών ατόμων. Σχετικά με την διαφοροποίηση των επιπέδων του στον ορό ασθενών με περιπρωθετική λοίμωξη από το *S. aureus*, αποδείξαμε αύξηση αυτών, όταν συγκρίθηκαν με τα επίπεδά του στον ορό ατόμων χωρίς λοίμωξη. Στο πεδίο της βιοπληροφορικής, από την ανάλυση που πραγματοποιήσαμε, αποδείξαμε ότι, το miR-21, μέσω της ικανότητάς του να ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων, εμπλέκεται στη διεξαγωγή πέντε σηματοδοτικών μονοπατιών της φλεγμονής και συγκεκριμένα στα μονοπάτια Pi3k-Akt, Mtor, Wnt, TGF- β και HIF και επιπροσθέτως, αναδείξαμε και τα γονίδια αυτών των μονοπατιών, των οποίων η έκφραση καταστέλλεται από το συγκεκριμένο miRNA.

Σχετικά με τα miR-16 και miR-223, τα αποτελέσματα της ερευνητικής ομάδας του Zhu B. και των συνεργατών του, προτείνουν ότι, η αυξημένη ενδοκυτταρική έκφραση του miR-16 που επάγεται από τη λοίμωξη HCV, αποτελεί ένα νέο μηχανισμό, ο οποίος συμβάλλει στην εξέλιξη της ηπατικής ίνωσης. (Zhu B, 2015), ενώ η ομάδα του Chen Luoquan και των συνεργατών του αποκάλυψαν, για πρώτη φορά, ένα νέο μηχανισμό, κατά τον οποίο η εκφραστική αύξηση του miR-223 ρυθμίζει θετικά την

παραγωγή των IFNs-I κατά τη λοίμωξη από τον ιό VSV. Σε ό,τι αφορά στην πιθανότητα χρήσης των διαφοροποιημένων επιπέδων των miR-16 και miR-223 στον ορό, ως βιοδείκτη λοιμώξεων, πραγματοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητες μελέτες, οι οποίες προσπάθησαν να τα χρησιμοποιήσουν ως βιοδείκτες διαχωρισμού της σήψης και του συνδρόμου συστηματικής φλεγμονώδους απόκρισης, με αντικρουόμενα, ωστόσο, αποτελέσματα. (Huijuan Wang, 2012) Η δική μας ερευνητική μελέτη, έδειξε εκφραστική αύξηση του miR-16 στο εσωτερικό των κυττάρων υμένα, ασθενών με περιπροθετική λοίμωξη από *S. aureus*, συγκριτικά με την έκφρασή του στα κύτταρα υμένα υγιών ατόμων και αύξηση των επιπέδων του στον ορό ασθενών με λοίμωξη, σε σύγκριση με αυτά του ορού ατόμων χωρίς λοίμωξη. Το τμήμα της βιοπληροφορικής ανάλυσης που αναφέρεται στο miR-16, αποκάλυψε τη συμμετοχή του στη λειτουργία των φλεγμονωδών σηματοδοτικών μονοπατιών του Pi3k-Akt, mTOR και TGF- β , όπως και τα γονίδια-στόχους του στα σηματοδοτικά αυτά μονοπάτια. Αναφορικά με το miR-223, τα αποτελέσματά μας έδειξαν μη στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασής του στα κύτταρα ασθενών με λοίμωξη, ενώ παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα από την εκτίμηση των επιπέδων του στον ορό των ασθενών.

Σχετικά με την ενδοκυτταρική λειτουργία της εκφραστικής αύξησης του miR-125b στις λοιμώξεις, απεδείχθη η συμβολή του στην καταστολή της φλεγμονώδους απόκρισης, στη λοίμωξη από το *Brucella abortus*, και στην επακόλουθη επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού, (Ning Liu, 2016) ενώ η διαταραχή των επιπέδων του στον ορό, μελετήθηκε από την ερευνητική ομάδα του Fang Xiong και των συνεργατών του, οι οποίοι τελικά απέδειξαν ότι, η αύξηση των επιπέδων του στον ορό ατόμων με λοίμωξη από τον ιό HBV, μπορεί να αποτελέσει δυνητικό βιοδείκτη πρώιμης διάγνωσης του, σχετιζόμενου με λοίμωξη HBV, ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, ακόμη και κατά το στάδιο της χρόνιας ηπατίτιδας B. (Fang Xiong, 2016) Στη δική μας έρευνα, παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης του miR-125b στα κύτταρα υμένα ασθενών με περιπροθετική λοίμωξη από το *S. aureus*, όπως και στον ορό των ατόμων με λοίμωξη, συγκριτικά με την έκφρασή του στα κύτταρα και στον ορό υγιών. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια της φλεγμονής, στα οποία φαίνεται να διαδραματίζει ενεργό ρόλο, είναι τα mTOR και HIF. Επίσης, η βιοπληροφορική ανάλυση έδειξε και τα γονίδια-στόχους του miR-125b στα σηματοδοτικά αυτά μονοπάτια.

Η επιστημονική ομάδα του L. Philippe και των συνεργατών του, μελέτησε τη συμβολή της ρυθμιστικής δράσης των miR-19a και miR-19b στη ρευματοειδή αρθρίτιδα και απέδειξε ότι, η μείωση της έκφρασής τους, σε ενδοκυτταρικό επίπεδο, είχε ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της φλεγμονώδους απόκρισης και την προώθηση των συμπτωμάτων της νόσου. (L. Philippe, 2012) Επίσης, σύμφωνα με τα αποτελέσματα μιας άλλης έρευνας, το miR-19b ενέχεται και στη ρύθμιση της

φλεγμονής κατά τη λοίμωξη από τον ιό JEV. (Usama Ashraf, 2016) Η διαφοροποίηση των επιπέδων του miR-19a στον ορό διερευνήθηκε από τον T. Motawi και τους συνεργάτες του, οι οποίοι, τελικά, απέδειξαν αύξηση των επιπέδων του στον ορό ασθενών με χρόνια λοίμωξη HCV. Η περαιτέρω ανάλυση των επιπέδων του, εντός της ομάδας των ασθενών με χρόνια λοίμωξη HCV, έδειξε μία σταδιακή μείωση αυτών κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της ηπατικής ίνωσης σε κίρρωση, και περαιτέρω μείωσή τους στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, υποδεικνύοντας ότι, η παρακολούθηση των επιπέδων του θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης παρακολούθησης αυτής της εξέλιξης. (Tarek K. Motawi, 2015) Ωστόσο, δεν υπάρχει κάποια δημοσιευμένη έρευνα στη βιβλιογραφία, η οποία να έχει επικεντρωθεί στο ενδεχόμενο χρήσης των διαφοροποιημένων επιπέδων του miR-19b στον ορό, ως βιοδείκτη λοιμωδών ασθενειών, και όσες υπάρχουν αναφέρονται κυρίως σε περιστατικά καρκίνου. Τα αποτελέσματα της δικής μας έρευνας, έδειξαν αύξηση της έκφρασης του miR-19a στα κύτταρα ασθενών με περιπρωθετική λοίμωξη από το *S. aureus*, ενώ σε ό,τι αφορά στη διαφοροποίηση των επιπέδων του στον ορό ατόμων με λοίμωξη, τα αποτελέσματα έδειξαν και εκεί αύξηση, συγκριτικά με τα επίπεδά του στον ορό υγιών ατόμων. Η βιοπληροφορική ανάλυση που πραγματοποιήσαμε, έδειξε τη συνεισφορά της ρυθμιστικής του δράσης στη γονιδιακή έκφραση, σε τρία σηματοδοτικά μονοπάτια της φλεγμονής, τα Pi3k-Akt, TGF- β και Jak-Stat, όπως και τα γονίδια-στόχους του στα συγκεκριμένα μονοπάτια. Σε ό,τι αφορά στη διαφοροποίηση της έκφρασης του miR-19b, ενδοκυτταρικά, αποδείχθηκε, βάσει της έρευνάς μας, εκφραστική αύξηση του συγκεκριμένου miRNA σε κύτταρα υμένα, ασθενών με περιπρωθετική λοίμωξη από το *S. aureus*, και αύξηση των επιπέδων του στον ορό ασθενών, όταν συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα σε άτομα χωρίς λοίμωξη. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια της φλεγμονώδους απόκρισης, στα οποία ενέχεται το miR-19b είναι τα Wnt και TGF- β . Αντίστοιχα, η βιοπληροφορική μας ανάλυση αποκάλυψε και τα γονίδια-στόχους του σε αυτά.

Τέλος, η επιστημονική ομάδα του Q. Song και των συνεργατών, έδειξε μείωση των επιπέδων του miR-365, ενδοκυτταρικά, καθώς και στον ορό, ασθενών με πνευμονική φυματίωση, (Qingzhang Song, 2015) σε αντίθεση με τα δικά μας αποτελέσματα, όπου καταγράφηκε μη στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασής του στα κύτταρα υμένα, όπως και στον ορό, ασθενών με περιπρωθετική λοίμωξη από το *S. aureus*.

Συμπεράσματα μελέτης

Εντοπίσαμε πέντε (5) miRNAs (miR-21, miR-16, miR-125b, miR-19a, miR-19b), τα οποία παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης στα κύτταρα αρθρικού υμένα και στον ορό, ασθενών με περιπρωθετική λοίμωξη από το *S. aureus*, συγκριτικά

με τα αντίστοιχα επίπεδά τους σε υγιή άτομα. Τα ευρήματα αυτά, έρχονται σε συμφωνία με τα πρόσφατα δεδομένα που υποστηρίζουν ότι, οι ιστοί και τα όργανα που βρίσκονται σε παθολογική κατάσταση απελευθερώνουν στο εξωκυττάριο περιβάλλον συγκεκριμένες κατηγορίες miRNAs, είτε με τη μορφή μεμβρανικών κυστιδίων που τα εσωκλείουν, είτε ως σύμπλοκα με εξειδικευμένες πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν την ικανότητα να προσδένονται σε RNA αλληλουχίες. Επομένως, είναι πιθανό, η εκφραστική αύξηση των πέντε miRNAs στο εσωτερικό των κυττάρων υμένα, ασθενών με περιπρωθετική λοίμωξη από το *S. aureus*, να οδήγησε στην επακόλουθη εξαγωγή τους στο εξωκυττάριο περιβάλλον, άρα και στην αύξηση των επιπέδων τους στον ορό των ατόμων αυτών. Επιπλέον, τα δεδομένα της βιοπληροφορικής ανάλυσης, που υποδεικνύουν μία πιθανή εμπλοκή των πέντε αυτών miRNAs σε βασικά σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται κατά τη φλεγμονώδη απόκριση, ενισχύουν ακόμη περισσότερο την υπόθεση ότι συνεισφέρουν στην παθολογία των λοιμώξεων από το *S. aureus*. Συνεπώς, η στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση των επιπέδων των miR-21, miR-16, miR-125b, miR-19a και miR-19b στον ορό και στα κύτταρα αρθρικού υμένα των ασθενών, αποτελεί μία τεκμηριωμένη ώθηση προς τη μελλοντική διερεύνηση, της ακριβούς λειτουργίας αυτών των miRNAs, στην παθοφυσιολογία λοιμώξεων που σχετίζονται με αυτόν τον παθογόνο μικροοργανισμό, αλλά και λοιμώξεων του μυοσκελετικού συστήματος, γενικότερα. Έτσι, θα καταστεί εφικτή στην κλινική πρακτική, η ασφαλής χρήση τους ως προγνωστικών βιοδεικτών λοιμώξεων του μυοσκελετικού συστήματος. Προς την επίτευξη αυτού του σκοπού, απαιτείται η επακριβής γνώση των γονιδίων-στόχων τους, τα οποία συμβάλλουν ενεργά στην εκδήλωση και στην εξέλιξη της λοίμωξης, καθώς και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που επηρεάζονται από την καταστολή της έκφρασης αυτών των γονιδίων. Τέλος, τα miR-223 και miR-365, έδειξαν μη στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασής τους, στα κύτταρα αρθρικού υμένα και στον ορό των ασθενών, η οποία, όμως, παρουσίαζε αυξητικές τάσεις. Δεδομένου ότι, έχει καταγραφεί στη βιβλιογραφία η διαφοροποίηση της έκφρασής τους σε περιπτώσεις λοιμώξεων, στα κύτταρα και στον ορό, καθώς και η ρυθμιστική τους επίδραση στην εξέλιξη των λοιμώξεων αυτών, μέσω της καταστολής της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων, συνεπάγεται ότι, μία μελλοντική ερευνητική εργασία με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, ενδεχομένως να αποκαλύπτει στατιστικά σημαντική εκφραστική αύξηση.

Βιβλιογραφία

- 1) Miriam García-Arias, PhD, Alejandro Balsa, MD, PhD, Emilio Martín Mola, MD, PhD. Septic arthritis. (2011). *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 25. 407–421
- 2) Daniel P Lew. Osteomyelitis. *Lancet* 2004; 364: 369–79
- 3) Principi N, Esposito S. Infectious Discitis and Spondylodiscitis in Children. *Infectious Discitis and Spondylodiscitis in Children*.
- 4) Tsai YH, Huang TJ, Hsu RW, Weng YJ, Hsu WH, Huang KC, Peng KT. Necrotizing soft-tissue infections and primary sepsis caused by *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* non-O1. *J Trauma*. 2009 Mar;66(3):899-905
- 5) Cook GE, Markel DC, Ren W, Webb LX, McKee MD, Schemitsch EH. Infection in Orthopaedics. *J Orthop Trauma*. 2015 Dec;29 Suppl 12:S19-23.
- 6) Goldenberg DL. Septic arthritis. *Lancet* 1998;351:197–202.
- 7) Burton PR, Clayton DG, Cardon LR, Craddock N, Deloukas P, Duncanson A, Kwiatkowski DP, McCarthy MI, Ouwehand WH, Samani NJ et al.: Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nat Genet* 2007, 39:1329-1337.
- 8) Lettre G, Rioux JD: Autoimmune diseases: insights from genome-wide association studies. *Hum Mol Genet* 2008, 17:R116-R121.
- 9) Barrett JC, Clayton DG, Concannon P, Akolkar B, Cooper JD, Erlich HA, Julier C, Morahan G, Nerup J, Nierras C et al.: Genomewide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nat Genet* 2009, 41:703-707.
- 10) Todd JA: Etiology of type 1 diabetes. *Immunity* 2010, 32:457-467.
- 11) Amy Leung, Dustin E Schones and Rama Natarajan. Using epigenetic mechanisms to understand the impact of common disease causing alleles. *Current Opinion in Immunology* 2012, 24:558–563
- 12) C. Skevaki, M. Pararas, K. Kostelidou, A. Tsakris and J. G. Routsias. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious diseases. (2015) *Clinical and Experimental Immunology*, 180:165 – 177
- 13) Hindorff LA, Sethupathy P, Junkins HA, Ramos EM, Mehta JP, Collins FS, Manolio TA: Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106:9362-9367.
- 14) Bell O, Tiwari VK, Thoma NH, Schubeler D: Determinants and dynamics of genome accessibility. *Nat Rev Genet* 2011, 12:554-564.

- 15) Reik W: Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* 2007, 447:425-432.
- 11) Cedar H, Bergman Y: Programming of DNA methylation patterns. *Annu Rev Biochem* 2012, 81:97-117.
- 16) Cedar H, Bergman Y: Programming of DNA methylation patterns. *Annu Rev Biochem* 2012, 81:97-117.
- 17) Baylin SB, Jones PA: A decade of exploring the cancer epigenome — biological and translational implications. *Nat Rev Cancer* 2011, 11:726-734.
- 18) Russo VEA, Martienssen RA, Riggs AD: *Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1996.
- 19) Kouzarides T: Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007, 128:693-705.
- 20) Krivtsov AV, Armstrong SA: MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer* 2007, 7:823-833.
- 21) Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A: An operational definition of epigenetics. *Genes and Development* 2009:781-783.
- 22) Broadbent HM, Peden JF, Lorkowski S, Goel A, Ongen H, Green F, Clarke R, Collins R, Franzosi MG, Tognoni G et al.: Susceptibility to coronary artery disease and diabetes is encoded by distinct, tightly linked SNPs in the ANRIL locus on chromosome 9p. *Hum Mol Genet* 2008, 17:806-814.
- 23) Cunningham MS, Santibanez Koref M, Mayosi BM, Burn J, Keavney B: Chromosome 9p21 SNPs associated with multiple disease phenotypes correlate with ANRIL expression. *PLoS Genet* 2010, 6:e1000899.
- 24) Kotake Y, Nakagawa T, Kitagawa K, Suzuki S, Liu N, Kitagawa M, Xiong Y: Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15(INK4B) tumor suppressor gene. *Oncogene* 2011, 30:1956-1962.
- 25) Pasmant E, Sabbagh A, Vidaud M, Bieche I: ANRIL, a long, noncoding RNA, is an unexpected major hotspot in GWAS. *FASEB J: Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2011, 25:444-448.
- 26) Yap KL, Li S, Munoz-Cabello AM, Raguz S, Zeng L, Mujtaba S, Gil J, Walsh MJ, Zhou M-M: Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Mol Cell* 2010, 38:662-674.
- 27) Kerkel K, Spadola A, Yuan E, Kosek J, Jiang L, Hod E, Li K, Murty VV, Schupf N, Vilain E et al.: Genomic surveys by methylation-sensitive SNP analysis identify sequencedependent allele-specific DNA methylation. *Nat Genet* 2008, 40:904-908.
- 28) Gertz J, Varley KE, Reddy TE, Bowling KM, Pauli F, Parker SL, Kucera KS, Willard HF, Myers RM: Analysis of DNA methylation in a three-generation family reveals widespread genetic influence on epigenetic regulation. *PLoS Genet* 2011:7.
- 29) Bell CG, Finer S, Lindgren CM, Wilson GA, Rakan VK, Teschendorff AE, Akan P, Stupka E, Down TA, Prokopenko I et al.: Integrated genetic and epigenetic analysis identifies haplotype-specific methylation in the FTO type 2 diabetes and obesity susceptibility locus. *PLoS ONE* 2010, 5:e14040. The authors use DNA methylation data in conjunction with GWAS studies to identify important genes related to diabetes.
- 30) Hu G, Schones DE, Cui K, Ybarra R, Northrup D, Tang Q, Gattinoni L, Restifo NP, Huang S, Zhao K: Regulation of nucleosome landscape and transcription factor targeting at tissue-specific enhancers by BRG1. *Genome Res* 2011, 21:1650-1658.

- 31) Kasowski M, Grubert F, Heffelfinger C, Hariharan M, Asabere A, Waszak SM, Habegger L, Rozowsky J, Shi M, Urban AE et al.: Variation in transcription factor binding among humans. *Science* 2010, 328:232-235. The authors investigated the effects of variants on transcription factor binding. They discovered that differences in transcription factor binding associated with variants within the binding motifs.
- 32) Reddy TE, Gertz J, Pauli F, Kucera KS, Varley KE, Newberry KM, Marinov GK, Mortazavi A, Williams BA, Song L et al.: Effects of sequence variation on differential allelic transcription factor occupancy and gene expression. *Genome Res* 2012, 22:860-869.
- 33) Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, Brant SR, Silverberg MS, Taylor KD, Barmada MM et al.: Genomewide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet* 2008, 40:955-962.
- 34) Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, Dixon AL, Strachan D, Heath S, Depner M, von Berg A, Bufe A, Rietschel E et al.: Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the
- 35) Verlaan DJ, Berlivet S, Hunninghake GM, Madore AM, Lariviere M, Moussette S, Grundberg E, Kwan T, Ouimet M, Ge B et al.: Allelespecific chromatin remodeling in the ZBP2/GSDMB/ORMDL3 locus associated with the risk of asthma and autoimmune disease. *Am J Hum Genet* 2009, 85:377-393.
- 36) Davison LJ, Wallace C, Cooper JD, Cope NF, Wilson NK, Smyth DJ, Howson JM, Saleh N, Al-Jeffery A, Angus KL et al.: Long-range DNA looping and gene expression analyses identify DEXI as an autoimmune disease candidate gene. *Hum Mol Genet* 2012, 21:322-333. The authors use of FAIRE, ChIP, and 3C assays to identify functional effects of common SNPs located in intronic region of CLEC16A that alter the expression of DEXI. This is an example of using epigenetic mechanisms to identify effects of common variants in autoimmune diseases.
- 37) Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997; 91:295–8.
- 38) Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, Carroll JD, Espevik T, IngallsRR, Radolf JD, GolenbockDT. 1999. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products *J Biol Chem* 274:33419–33425.
- 39) Means TK, Wang S, Lien E, Yoshimura A, Golenbock DT, Fenton MJ. 1999 Human toll-like receptors mediate cellular activation by Mycobacterium tuberculosis *J Immunol* 163:3920–3927.
- 40) Doyle SL, O'Neill LA. 2006. Toll-like receptors: from the discovery of NF-κB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem Pharmacol* 72:1102–1113.
- 41) Hawn TR, Scholes D, Wang H, Li SS, Stapleton AE, Janer M, Aderem A, Stamm WE, Zhao LP, Hooton TM. 2009b. Genetic variation of the human urinary tract innate immune response and asymptomatic bacteriuria in women. *PLoS One* 4:e8300.
- 42) Kijpittayarit S, Eid AJ, Brown RA, Paya CV, Razonable RR. 2007. Relationship between Toll-like receptor 2 polymorphism and cytomegalovirus disease after liver transplantation. *Clin Infect Dis* 44:1315–1320.
- 43) Kang SH, Abdel-Massih RC, Brown RA, Dierkhising RA, Kremers WK, Razonable RR. 2012. Homozygosity for the toll-like receptor 2 R753Q single-nucleotide polymorphism is a risk factor for cytomegalovirus disease after liver transplantation. *J Infect Dis* 205:639–646.

- 44) Vuononvirta J, Toivonen L, Grondahl-Yli-Hannuksela K, Barkoff AM, Lindholm L, Mertsola J, Peltola V, He Q. 2011. Nasopharyngeal bacterial colonization and gene polymorphisms of mannose-binding lectin and toll-like receptors 2 and 4 in infants. *PLoS One* 6:e26198.
- 45) Lee SO, Brown RA, Kang SH, Abdel-Massih RC, Razonable RR. 2011. Toll-like receptor 2 polymorphism and Gram-positive bacterial infections after liver transplantation. *Liver Transpl* 17:1081–1088.
- 46) Yim JJ, Lee HW, Lee HS, Kim YW, Han SK, Shim YS, Holland SM. 2006. The association between microsatellite polymorphisms in intron II of the human Toll-like receptor 2 gene and tuberculosis among Koreans. *Genes Immun* 7:150–155.
- 47) Etokebe GE, Skjeldal F, Nilsen N, Rodionov D, Knezevic J, Bulat-Kardum L, Espevik T, Bakke O, Dembic Z. 2010. Toll-like receptor 2 (P631H) mutant impairs membrane internalization and is a dominant negative allele. *Scand J Immunol* 71:369–381.
- 48) Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE, Lowry SF. 2002. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis* 186:1522–1525.
- 49) Lorenz E, Hallman M, Marttila R, Haataja R, Schwartz DA. 2002a. Association between the Asp299Gly polymorphisms in the Toll-like receptor 4 and premature births in the Finnish population. *Pediatr Res* 52:373–376.
- 50) Radstake TR, Franke B, Hanssen S, Netea MG, Welsing P, Barrera P, Joosten LA, van Riel PL, van den Berg WB. 2004. The Toll-like receptor 4 Asp299Gly functional variant is associated TLR POLYMORPHISMS AND DISEASE 481 with decreased rheumatoid arthritis disease susceptibility but does not influence disease severity and/or outcome. *Arthritis Rheum* 50:999–1001.
- 51) Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. 2000. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 25:187–191.
- 52) Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Schwartz DA. 2002b. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med* 162:1028–1032.
- 53) Barber RC, Aragaki CC, Rivera-Chavez FA, Purdue GF, Hunt JL, Horton JW. 2004. TLR4 and TNF-alpha polymorphisms are associated with an increased risk for severe sepsis following burn injury. *J Med Genet* 41:808–813.
- 54) Barber RC, Chang LY, Arnoldo BD, Purdue GF, Hunt JL, Horton JW, Aragaki CC. 2006. Innate immunity SNPs are associated with risk for severe sepsis after burn injury. *Clin Med Res* 4:250–255.
- 55) Awomoyi AA, Rallabhandi P, Pollin TI, Lorenz E, Szein MB, Boukhvalova MS, Hemming VG, Blanco JC, Vogel SN. 2007. Association of TLR4 polymorphisms with symptomatic respiratory syncytial virus infection in high-risk infants and young children. *J Immunol* 179:3171–3177.
- 56) Tal G, Mandelberg A, Dalal I, Cesar K, Somekh E, Tal A, Oron A, Itskovich S, Ballin A, Hourli S, Beigelman A, Lider O, Rechavi G, Amariglio N. 2004. Association between common Toll-like receptor 4 mutations and severe respiratory syncytial virus disease. *J Infect Dis* 189:2057–2063.
- 57) Ferwerda B, Kibiki GS, Netea MG, Dolmans WM, van der Ven AJ. 2007 The toll-like receptor 4 Asp299Gly variant and tuberculosis susceptibility in HIV-infected patients in Tanzania. *AIDS* 21:1375–1377.

- 58) Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, Willeit J, Schwartz DA. 2002b. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med* 347:185–192.
- 59) Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010; 140:805–820.
- 60) Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010; 11:373–384.
- 61) Medzhitov R, Horng T. Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9:692–703.
- 62) Jeannin P, Jaillon S, Delneste Y. Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells. *Curr Opin Immunol*. 2008; 20:530–537.
- 63) Mills KH. TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11:807–822.
- 64) O'Connell RM, Rao DS, Baltimore D. microRNA regulation of inflammatory responses. *Annu Rev Immunol*. 2012; 30:295–312.
- 65) Ruland J. Return to homeostasis: downregulation of NF-kappaB responses. *Nat Immunol*. 2011; 12:709–714.
- 66) Priscila Maria Colavite and Alexandrina Sartori. Septic arthritis: immunopathogenesis, experimental models and therapy. Colavite and Sartori *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 2014, 20:19
- 67) Nade S: Septic arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2003, 17(2):183–200.
- 68) Kaandorp CJ, Van Schaardenburg D, Krijnen P, Habbema JD, van de Laar MA: Risk factors for septic arthritis in patients with joint disease. A prospective study. *Arthritis Rheum* 1995, 38(12):1819–1825.
- 69) Goldenberg DL, Reed RL. 1985. Bacterial arthritis. *N Engl J Med* 312:764–769.
- 70) Bremell T, Abdelnour A, Tarkowski A: Histopathological and serological progression of experimental *Staphylococcus aureus* arthritis. *Infect Immun* 1992, 60(7):2976–2985.
- 71) Verdrengh M, Carlsten H, Ohlsson C, Tarkowski A: Rapid systemic bone resorption during the course of *Staphylococcus aureus*-induced arthritis. *J Infect Dis* 2006, 194(11):1597–1600.
- 72) Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, McCabe S, Wong T, Campagnuolo G, Moran E, Bogoch ER, Van G, Nguyen LT, Ohashi PS, Lacey DL, Fish E, Boyle WJ, Penninger JM: Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 1999, 402(6759):304–309.

- 73) Campagnuolo G, Bolon B, Feige U: Kinetics of bone protection by recombinant osteoprotegerin therapy in Lewis rats with adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum* 2002, 46(7):1926–1936.
- 74) Clerc O, Prod'homme G, Greub G, Zanetti G, Senn L: Adult native septic arthritis: a review of 10 years of experience and lessons for empirical antibiotic therapy. *J Antimicrob Chemother* 2011, 66(5):1168–1173.
- 75) Howard-Jones AR, Isaacs D, Gibbons PJ: Twelve-month outcome following septic arthritis in children. *J Pediatr Orthop B* 2013, 22(5):486–490.
- 76) Le Dantec L, Maury F, Flipo RM, Laskri S, Cortet B, Duquesnoy B, Delcambre B: Peripheral pyogenic arthritis. A study of one hundred seventy-nine cases. *Rev Rhum Engl Ed* 1996, 63(2):103–110.
- 77) Ryan MJ, Kavanagh R, Wall PG, Hazleman BL: Bacterial joint infections in England and Wales: analysis of bacterial isolates over a four year period. *Br J Rheumatol* 1997, 36(3):370–373.
- 78) McDevitt D, Francois P, Vaudaux P, Foster TJ: Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 1994, 11(2):237–248.
- 79) Gillaspie AF, Patti JM, Smeltzer MS: Transcriptional regulation of the *Staphylococcus aureus* collagen adhesin gene, *cna*. *Infect Immun* 1997, 65(4):1536–1540.
- 80) Jonsson K, Signas C, Müller HP, Lindberg M: Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*. The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene. *Eur J Biochem* 1991, 202(3):1041–1048.
- 81) Wann ER, Gurusiddappa S, Hook M: The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen. *J Biol Chem* 2000, 275(18):13863–13871.
- 82) Roche FM, Downer R, Keane F, Speziale P, Park PW, Foster TJ: The N-terminal A domain of fibronectin-binding proteins A and B promotes adhesion of *Staphylococcus aureus* to elastin. *J Biol Chem* 2004, 279(37):38433–38440.
- 83) Sinha B, François PP, Nüsse O, Foti M, Hartford OM, Vaudaux P, Foster TJ, Lew DP, Herrmann M, Krause KH: Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin $\alpha 5 \beta 1$. *Cell Microbiol* 1999, 1(2):101–117.
- 84) McElroy MC, Cain DJ, Tyrrell C, Foster TJ, Haslett C: Increased virulence of a fibronectin-binding protein mutant of *Staphylococcus aureus* in a rat model of pneumonia. *Infect Immun* 2002, 70(7):3865–3873.

- 85) Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M: Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol* 2013, 12(1):49–62.
- 86) Otto M: Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu Rev Med* 2013, 64:175–188.
- 87) Brooks JL, Jefferson KK: Staphylococcal biofilms: quest for the magic bullet. *Adv Appl Microbiol* 2012, 81:63–87.
- 88) Kim JH, Muto CA, Pascule AW, Vergis EN: Invasive polyarticular septic arthritis caused by nontypeable *Haemophilus influenzae* in a young adult: a case report and literature review. *J Clin Rheumatol* 2011, 7(7):380–382.
- 89) Coakley G, Mathews C, Field M, Jones A, Kingsley G, Walker D, et al. On behalf of the British Society for rheumatology standards, guidelines and audit working group. BSR & BHPR, BOA, RCGP and BSAC guidelines for management of the hot swollen joint in adults. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45:1039–41.
- 90) Steckelberg JM, Osmon DB. In: Bisno AL, Waldvogel FA, editors. *Prosthetic joint infection*. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2000. p. 173–209.
- 91) Zimmerli W, Trampuz A, Oschner PE. Prosthetic-joint infections. *New England Journal of Medicine* 2004;351:1645–54.
- 92) Francois P, Vaudaux P, Lew PD. Role of plasma and extracellular matrix proteins in the physiopathology of foreign body infections. *Annals of Vascular Surgery* 1998;12:34–40.
- 93) Roisman FR, Walz DT, Finkelshtein AE. Superoxide radical production by human leukocytes exposed to immune complexes: inhibitory action of gold compounds. *Inflammation* 1983;7:355–62.
- 94) Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;284:1318–22.
- 95) Parvizi J, Jacovides C, Zmistowski B, Jung KA. Definition of periprosthetic joint infection: Is there a consensus? *Clin Orthop Relat Res*. 2011 July 13 [Epub ahead of print].
- 96) Javad Parvizi MD, Benjamin Zmistowski BS, Elie F. Berbari MD, Thomas W. Bauer MD, PhD, Bryan D. Springer MD, Craig J. Della Valle MD, Kevin L. Garvin MD, Michael A. Mont MD, Montri D. Wongworawat MD, Charalampos G. Zalavras MD. New Definition for Periprosthetic Joint Infection. *Clin Orthop Relat Res* (2011) 469:2992–2994

- 97) Gjertsson I, Hultgren OH, Stenson M, Holmdahl R, Tarkowski A: Are B lymphocytes of importance in severe *Staphylococcus aureus* infections? *Infect Immun* 2000, 68(5):2431–2434.
- 98) Kim JS, Jordan MS: Diversity of IL-17-producing T lymphocytes. *Cell Mol Life Sci* 2013, 70(13):2271–2290.
- 99) Nakae S, Saijo S, Horai R, Sudo K, Mori S, Iwakura Y: IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100(10):5986–5990.
- 100) Henningsson L, Jirholt P, Lindholm C, Eneljung T, Silverpil E, Iwakura Y, Linden A, Gjertsson I: Interleukin-17a during local and systemic *Staphylococcus aureus*-induced arthritis in mice. *Infect Immun* 2010, 78(9):3783–3790.
- 101) Colavite-Machado PM, Ishikawa LLW, França TGD, Zorzella-Pezavento SFG, da Rosa LC, Chiuso-Minicucci F, da Cunha MLR, Garlet GP, Sartori A: Differential arthritogenicity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from biological samples. *BMC Infect Dis* 2013, 13:400. doi:10.1186/1471-2334-13-400.
- 102) Kwan Tat S, Padrines M, Théoleyre S, Heymann D, Fortun Y: IL-6, RANKL, TNF- α /IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004, 15(1):49–60.
- 103) Gjertsson, I., M. Innocenti, L. M. Matrisian, and A. Tarkowski. 2005. Metalloproteinase-7 contributes to joint destruction in *Staphylococcus aureus* induced arthritis. *Microb. Pathog.* 38:97–105.
- 104) Shirliff, M. E., and J. T. Mader. 2002. Acute septic arthritis. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:527–544.
- 105) Wright, J. A., and S. P. Nair. Interaction of staphylococci with bone. *Int. J. Med. Microbiol.* 2010 Feb;300(2-3):193-204
- 106) Murphy, G., and H. Nagase. 2008. Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: destruction or repair? *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 4:128–135.
- 107) Bartok, B., and G. S. Firestein. 2010. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol. Rev.* 233:233–255.
- 108) Mor, A., S. B. Abramson, and M. H. Pillinger. 2005. The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction. *Clin. Immunol.* 115:118–128.
- 109) Noss, E. H., and M. B. Brenner. 2008. The role and therapeutic implications of fibroblast-like synoviocytes in inflammation and cartilage erosion in rheumatoid arthritis. *Immunol. Rev.* 223:252–270.

- 110) Romina Scian, Paula Barrionuevo, Guillermo H. Giambartolomei, Emilio A. De Simone, Silvia I. Vanzulli, Carlos A. Fossati, Pablo C. Baldi, and M. Victoria Delpino. Potential Role of Fibroblast-Like Synoviocytes in Joint Damage Induced by *Brucella abortus* Infection through Production and Induction of Matrix Metalloproteinases. *INFECTION AND IMMUNITY*, Sept. 2011, p. 3619–3632
- 111) Seibl, R., et al. 2003. Expression and regulation of Toll-like receptor 2 in rheumatoid arthritis synovium. *Am. J. Pathol.* 162:1221–1227.
- 112) Kanangat, S., et al. 2006. Induction of multiple matrix metalloproteinases in human dermal and synovial fibroblasts by *Staphylococcus aureus*: implications in the pathogenesis of septic arthritis and other soft tissue infections. *Arthritis Res. Ther.* 8:R176.
- 113) Kyburz, D., et al. 2003. Bacterial peptidoglycans but not CpG oligodeoxynucleotides activate synovial fibroblasts by Toll-like receptor signaling. *Arthritis Rheum.* 48:642–650.
- 114) Gay NJ, Gangloff M. Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu Rev Biochem* 2007; 76: 141–165.
- 115) Bowie A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol.* 2000 Apr; 67(4):508-14.
- 116) Kiyoshi Takeda and Shizuo Akira. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology* (2005), Vol. 17, No. 1, pp. 1–14
- 117) Ohashi, K., Burkart, V., Flohe, S. & Kolb, H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J. Immunol.* 164, 558–561 (2000).
- 118) Vabulas, R. M. et al. Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J. Biol. Chem.* 276, 31332–31339 (2001).
- 119) Vabulas, R. M. et al. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 15107–15112 (2002).
- 120) Asea, A. et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Biol. Chem.* 277, 15028–15034 (2002).
- 121) Dybdahl, B. et al. Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through Toll-like receptor-4. *Circulation* 105,685–690 (2002).
- 122) Vabulas, R. M. et al. The endoplasmic reticulum resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 20847–20853 (2002).

- 123) Roelofs, M. F. et al. Identification of small heat shock protein B8 (HSP22) as a novel TLR4 ligand and potential involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 176, 7021–7027 (2006).
- 124) Okamura, Y. et al. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* 276, 10229–10233 (2001).
- 125) Smiley, S. T., King, J. A. & Hancock, W. W. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J. Immunol.* 167, 2887–2894 (2001).
- 126) Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 2011;30(1):16e34. Epub 2011/01/18
- 127) Hedayat M, Netea MG, Rezaei N. Targeting of Toll-like receptors: a decade of progress in combating infectious diseases. *Lancet Infect Dis* 2011;11(9):702e12
- 128) Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G et al. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 2001; 413: 78–83.
- 129) Akira S, Yamamoto M, Takeda K. Role of adapters in Toll-like receptor signalling. *Biochem Soc Trans* 2003; 31: 637–642.
- 130) Brikos C, O'Neill LA. Signalling of toll-like receptors. *Handb Exp Pharmacol* 2008; 183:21–50.
- 131) Rui Zhou, Xiaoqing Li, Guoku Hu, Ai-Yu Gong, Kristen M. Drescher, Xian-Ming Chen. miR-16 Targets Transcriptional Corepressor SMRT and Modulates NF-kappaB-Regulated Transactivation of Interleukin-8 Gene. (2012). *PLoS ONE* 7(1): e30772.
- 132) Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281- 97
- 133) M. R. Fabian, N. Sonenberg, and W. Filipowicz, “Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs,” *Annual Review of Biochemistry*, vol. 79, pp. 351–379, 2010.
- 134) R.C. Friedman, K.K. Farh, C.B. Burge, and D.P. Bartel. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19: 92–105, 2009.
- 135) Clark K, Nanda S and Cohen P (2013) Molecular control of the NEMO family of ubiquitin-binding proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 673-685
- 136) Arthur JS and Ley SC (2013) Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 13, 679-692
- 137) Coll RC and O'Neill LA (2010) New insights into the regulation of signalling by toll-like receptors and nod-like receptors. *J Innate Immun* 2, 406-421
- 138) Symons A, Beinke S and Ley SC (2006) MAP kinase kinase kinases and innate immunity. *Trends Immunol* 27, 40-48

- 139) Cohen P (2014) The TLR and IL-1 signalling network at a glance. *J Cell Sci* 127, 2383-2390
- 140) Ambros V (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature* 431: 350–355.
- Krol J, Loedige I, Filipowicz W (2010) The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 11: 597–610.
- 141) Xiaobing He, Zhizhong Jing, and Guofeng Cheng, MicroRNAs: New Regulators of Toll-Like Receptor Signalling Pathways, BioMed Research International, Volume 2014, Article ID 945169, 14 pages, 2014
- 142) Zhou R, O'Hara SP, Chen XM (2011) MicroRNA regulation of innate immune responses in epithelial cells. *Cell Mol Immunol* 8: 371–379.
- 143) O'Neill LA, Sheedy FJ, McCoy CE (2011) MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 11: 163–175.
- 144) Kobayashi KS, Flavell RA (2004) Shielding the double-edged sword: negative regulation of the innate immune system. *J Leukoc Biol* 75: 428–433.
- 145) Chen XM, O'Hara SP, LaRusso NF (2008) The immunobiology of cholangiocytes. *Immunol Cell Biol* 86: 497–505.
- 146) V. Ambros. microRNAs: Tiny regulators with great potential. *Cell* 107: 823–826, 2001.
- 147) R.C. Lee and V. Ambros. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294: 862–864, 2001.
- 148) M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, W. Lendeckel, and T. Tuschl. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294: 853–858, 2001.
- 149) N.C. Lau, L.P. Lim, E.G. Weinstein, and D.P. Bartel. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294: 858–862, 2001.
- 150) D.P. Bartel. microRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell* 136: 215–233, 2009.
- 151) Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S. & Bartel, D. P. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466, 835–840 (2010).
- 152) A.E. Pasquinelli, B.J. Reinhart, F. Slack, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408: 86–89, 2000.
- 153) H.K. Saini, A.J. Enright, and S. Griffiths-Jones. Annotation of mammalian primary microRNAs. *BMC Genomics* 9: 564, 2008.
- 154) E. Sonkoly, T. Wei, P. C. J. Janson et al., “MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis?” *PloS One*, vol. 2, no. 7, p. e610, 2007.

- 155) D. Catalucci, M.V. Latronico, and G. Condorelli. microRNAs control gene expression: Importance for cardiac development and pathophysiology. *Ann N Y Acad Sci* 1123: 20–29, 2008.
- 156) C. Xiao, L. Srinivasan, D.P. Calado, et al. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol* 9: 405–414, 2008.
- 157) A. Ventura, A.G. Young, M.M. Winslow, et al. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* 132: 875–886, 2008.
- 158) Xi Chen, Hongwei Liang, Junfeng Zhang, Ke Zen and Chen-Yu Zhang. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. (2012). *Trends in Cell Biology*, Vol. 22, No. 3
- 159) Kim, V.N. et al. (2009) Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 126–139
- 160) M. Selbach, B. Schwanhausser, N. Thierfelder, et al. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 455: 58–63, 2008.
- 161) D. Baek, J. Villen, C. Shin, et al. The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 455: 64–71, 2008.
- 162) L. A. Yates, C. J. Norbury, and R. J. Gilbert, “The long and short of microRNA,” *Cell*, vol. 53, no. 3, pp. 516–519, 2013.
- 163) Eulalio, A., Schulte, L. and Vogel, J. (2012) The mammalian microRNA response to bacterial infections. *RNA Biol.* 9.
- 164) Staedel, C. and Darfeuille, F. (2013) MicroRNAs and bacterial infection. *Cell. Microbiol.* 15, 1496–1507.
- 165) Cullen, B.R. (2011) Viruses and microRNAs: RISCy interactions with serious consequences. *Genes Dev.* 25, 1881–1894.
- 166) Claire Maudet, Miguel Mano, Ana Eulalio. MicroRNAs in the interaction between host and bacterial pathogens. *FEBS Letters* 588 (2014) 4140–4147
- 167) Taganov, K.D., Boldin, M.P., Chang, K.J. and Baltimore, D. (2006) NF- κ B dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 12481–12486.
- 168) Alton Etheridge, Inyoul Lee, Leroy Hood, David Galas, and Kai Wang. 2011. Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. *Mutat Res.* 717: 85-90
- 169) Weber JA, Baxter DH, Zhang S. et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 2010; 56:1733-41.
- 170) Rayner KJ, Hennessy EJ. Extracellular communication via microRNA: lipid particles have a new message. *J Lipid Res* 2013; 54:1174-81.

- 171) Shuangli Mi, Jian Zhang, Wei Zhang and R. Stephanie Huang. 2013. Circulating MicroRNAs as Biomarkers for Inflammatory Diseases. *Microna*. 2: 64-72
- 172) Ji X, Takahashi R, Hiura Y, et al. Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury. *Clin Chem*. 2009; 55:1944–9. [PubMed: 19696117]
- 173) Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia*. 2006;20:1487–95.
- 174) Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, Altevogt P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett*. 2006;107:102–8.
- 175) Cocucci, E. et al. (2009) Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol*. 19, 43–51
- 176) Hurley, J.H. (2008) ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Curr. Opin. Cell Biol*. 20, 4–11
- 177) Williams, R.L. and Urbe, S. (2007) The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 8, 355–368
- 178) Kosaka, N. et al. (2010) Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J. Biol. Chem*. 285, 17442–17452
- 179) Zhang, Y.J. et al. (2010) Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol. Cell* 39, 133–144
- 180) Gibbins, D.J. et al. (2009) Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat. Cell Biol*. 11, 1143–1149
- 181) Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007; 9:654–9. [PubMed: 17486113]
- 182) Hunter MP, Ismail N, Zhang X, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One*. 2008; 3:e3694. [PubMed: 19002258]
- 183) Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol*. 2011; 13:423–33. [PubMed: 21423178]
- 184) Zerneck A, Bidzhekov K, Noels H, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal*. 2009; 2:ra81. [PubMed: 19996457]
- 185) Turchinovich, A. et al. (2011) Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res*. 39, 7223–7233

- 186) Arroyo, J.D. et al. (2011) Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 5003–5008
- 187) Wang, K. et al. (2010) Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 38, 7248–7259
- 188) Yanni Chen, Junbo Chen, Hui Wang, Jingjing Shi, Kailang Wu, Shi Liu, Yingle Liu, Jianguo Wu. HCV-Induced miR-21 Contributes to Evasion of Host Immune System by Targeting MyD88 and IRAK1. *PLoS Pathog* 9(4): e1003248.
- 189) Zhu B, Wei XX, Wang TB, Zhou YC, Liu AM, Zhang GW. Increased miR-16 expression induced by hepatitis C virus infection promotes liver fibrosis through downregulation of hepatocyte growth factor and Smad7. *Arch Virol.* 2015 Aug;160(8):2043-50.
- 190) Luoquan Chen, Yinjing Song, Li He, Xiaopeng Wan, Lihua Lai, Feng Dai, Yang Liu, and Qingqing Wang. MicroRNA-223 Promotes Type I Interferon Production in Antiviral Innate Immunity by Targeting ForkheadBox Protein O3(FOXO3). May 13, 2016 *J. Biol. Chem.*
- 191) Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N., and Taniguchi, T. (2005) IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature.* 434, 772-777
- 192) Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., Nakaya, T., Katsuki, M., Noguchi, S., Tanaka, N., and Taniguchi, T. (2000) Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN- α /beta gene induction. *Immunity.* 13, 539-548
- 193) Sato, M., Hata, N., Asagiri, M., Nakaya, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (1998) Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *Febs Letters.* 441, 106-110
- 194) Marie, I., Durbin, J. E., and Levy, D. E. (1998) Differential viral induction of distinct interferon- α genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J.* 17, 6660-6669
- 195) Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature.* 2006;441(7092):431–6.
- 196) Ning Liu, Lin Wang, Changjiang Sun, Li Yang, Wanchun Sun and Qisheng Peng. MicroRNA-125b-5p suppresses *Brucella abortus* intracellular survival via control of A20 expression. *BMC Microbiology* (2016) 16:171
- 197) Lucas Philippe, Ghada Alsaleh, Guillaume Suffert, Alain Meyer, Philippe Georgel, Jean Sibilia, Dominique Wachsmann and Sébastien Pfeffer. TLR2 Expression Is

Regulated by MicroRNA miR-19 in Rheumatoid Fibroblast-like Synoviocytes. *J Immunol* 2012; 188:454-461

198) Usama Ashraf, Bibo Zhu, Jing Ye, Shengfeng Wan, Yanru Nie, Zheng Chen, Min Cui, Chong Wang, Xiaodong Duan, Hao Zhang, Huanchun Chen, Shengbo Cao. MicroRNA-19b-3p Modulates Japanese Encephalitis Virus-Mediated Inflammation via Targeting RNF11. *Journal of Virology*. May 2016, Volume 90, Number 9. *Arch Virol*. 2015 Aug;160(8):2043-50.

199) Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, Harris AL. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British Journal of Haematology*. 2008; 141(5):672–5.

200) Bihrer V, Waidmann O, Friedrich-Rust M, et al. Serum microRNA-21 as marker for necroinflammation in hepatitis C patients with and without hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2011;6:e26971.

201) Otto GP, Sossdorf M, Claus RA, Rodel J, Menge K, Reinhart K, et al. The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Crit Care* 2011;15:R183.

202) Harbarth S, Holeckova K, Froidevaux C, Pittet D, Ricou B, Grau GE, et al. Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:396 – 402.

203) Meynaar IA, Droog W, Batstra M, Vreede R, Herbrink P. In critically ill patients, serum procalcitonin is more useful in differentiating between sepsis and sirs than crp, il-6, or lbp. *Crit Care Res Pract* 2011;2011:594645.

204) Tang BM, Eslick GD, Craig JC, McLean AS. Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007;7:210 – 7.

205) Wang F, Wang J, Liu D, Su Y. Normalizing genes for real-time polymerase chain reaction in epithelial and nonepithelial cells of mouse small intestine. *Anal Biochem* 2010;399:211 – 7.

206) Huijuan Wang, Pengjun Zhang, Weijun Chen, Dan Feng, Yanhong Jia and Li-xin Xie. Evidence for serum miR-15a and miR-16 levels as biomarkers that distinguish sepsis from systemic inflammatory response syndrome in human subjects. *Clin Chem Lab Med* 2012;50(8):1423–1428

207) Fang Xiong, Hong Ma, Yachao Qu, Fei Wen, Xuli Bao, Dazheng Han, Jun Lu. Profiles of serum miR-99a, let-7c and miR-125b in hepatitis B virus (HBV)-associated chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2016;9(7):7087-7095

- 208) Lok AS, Seeff LB, Morgan TR, di Bisceglie AM, Sterling RK, Curto TM, et al. Incidence of hepatocellular carcinoma and associated risk factors in hepatitis C-related advanced liver disease. *Gastroenterology*. 2009; 136: 138–148.
- 209) Tarek K. Motawi, Olfat G. Shaker, Shohda A. El-Maraghy, Mahmoud A. Senousy. Serum MicroRNAs as Potential Biomarkers for Early Diagnosis of Hepatitis C Virus-Related Hepatocellular Carcinoma in Egyptian Patients (2015). *PLoS ONE* 10(9): e0137706
- 210) Baeuerle PA and Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 141-179.
- 211) Qingzhang Song, Hui Li, Hua Shao, Chunling Li, Xiao Lu. MicroRNA-365 in macrophages regulates Mycobacterium tuberculosis-induced active pulmonary tuberculosis via interleukin-6. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(9):15458-15465
- 212) Kanehisa M, Goto S: KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 2000, 28:27–30.
- 213) John J. O'Shea and Peter J. Murray. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity*. 2008 April ; 28(4): 477–487.
- 214) Shomyseh Sanjabi, Lauren A. Zenewicz, Masahito Kamanaka, and Richard A. Flavell. Anti- and Pro-inflammatory Roles of TGF- β , IL-10, and IL-22 In Immunity and Autoimmunity. *Curr Opin Pharmacol*. 2009 August ; 9(4): 447–453.
- 215) Octavio Silva-García, Juan J. Valdez-Alarcón, and Víctor M. Baizabal-Aguirre. The Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway Controls the Inflammatory Response in Infections Caused by Pathogenic Bacteria. *Mediators of Inflammation*. Volume 2014, Article ID 310183, 7 pages.
- 216) Anne Fougerat, Stéphanie Gayral, Nicole Malet, Fabienne Briand-Mesange, Monique Breton-Douillon and Muriel Laffargue. Phosphoinositide 3-kinases and their role in inflammation: potential clinical targets in atherosclerosis?. *Clinical Science* (2009) 116, 791–804 (Printed in Great Britain)
- 217) Thomas Weichhart, Markus Hengstschläger and Monika Linke. Regulation of innate immune cell function by mTOR. *IMMUNOLOGY*. VOLUME 15. OCTOBER 2015.
- 218) Asis Palazon, Ananda W. Goldrath, Victor Nizet and Randall S. Johnson. HIF Transcription Factors, Inflammation, and Immunity. *Immunity* 41(2014).

